

Ribopyranosylierte Peptide als Bausteine für den reversiblen Aufbau von Bisubstrat-Inhibitoren der Proteinkinase A

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ROMINA ANNA KIRSCHNER, M. SC.

aus Dodenhäusen

Marburg an der Lahn 2017

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität
als Dissertation angenommen am: 11.08.2017

Erstgutachter: Prof. Dr. Armin Geyer

Zweitgutachter: Jun. Prof. Dr. Olalla Vázquez

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2017

Hochschulkennziffer: 1180

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2014 bis Februar 2017
am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt

PROF. DR. ARMIN GEYER

für die Bereitstellung der interessanten Thematik, dem großen Freiraum bei der Durchführung und den hilfreichen Denkanstößen im Zuge unserer Gespräche.

„Wenn du nicht irrst, kommst du nicht zu Verstand!

Willst du entstehn, entsteh auf eigne Hand!“

Mephistopheles in *Faust II*, JOHANN WOLFGANG VON GOETHE

Kurzzusammenfassung

In dieser Arbeit dient die reversible Chemie als neue Strategie für die kovalente Verknüpfung eines peptidischen, Substrat-ähnlichen Inhibitors mit einem niedermolekularen, heterozyklischen Inhibitor des aktiven Zentrums. Bisher wurden Bisubstrat-Inhibitoren lediglich als irreversibel verknüpfte Moleküle eingesetzt, deren Nachteil in ihrer geringen Variationsbreite bestand. Der hier verfolgte modulare Ansatz wird an dem Testsystem der Proteinkinase A erprobt und ermöglicht die Kombination unterschiedlicher Paare von Peptid- und heterozyklischem Inhibitor. Die Verknüpfung entsteht dabei durch eine spontane Veresterung eines Boronsäure-modifizierten Inhibitors mit dem Diol-Motiv einer glykosylierten Aminosäure, welche in die Substrat Sequenz eingebaut wurde. Dabei bildet die supramolekulare Umgebung des Proteins das Grundgerüst für die Veresterung beider Komponenten im aktiven Zentrum. Ziel der Synthese von Bisubstrat-Inhibitoren ist es, eine potentiell größere Toleranz niedrig-affiner Inhibitoren durch dessen Anbindung an hoch-affine Substrate und *vice versa* zu ermöglichen. Darüber hinaus ist die Strategie der reversiblen Assemblierung von Bisubstrat-Inhibitoren unabhängig von dem untersuchten Beispiel und es besteht das Potential für die Übertragbarkeit auf andere Zielsetzungen.

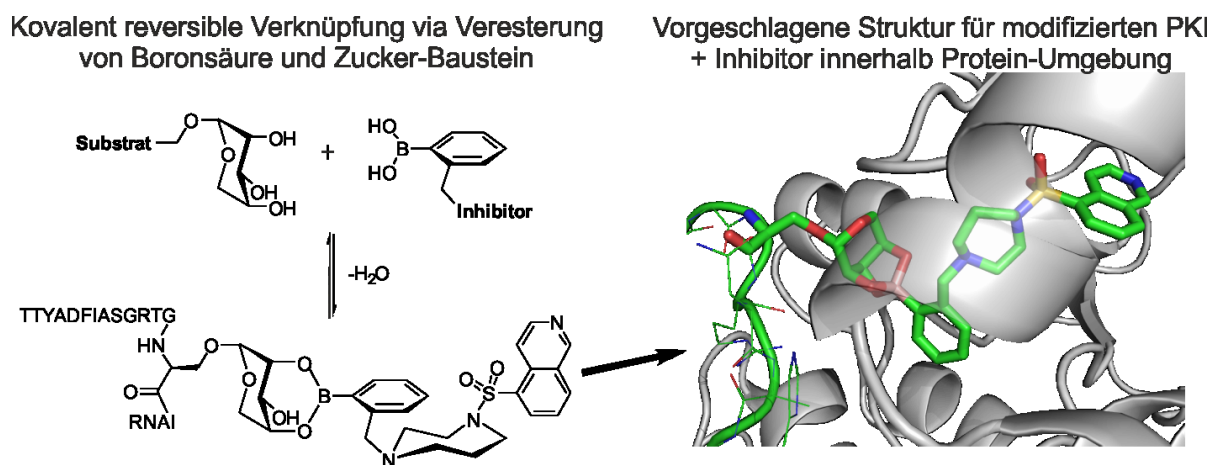


Abbildung I. Generelles Prinzip der Bisubstrat-Inhibitor Bildung durch Verknüpfung des Substrat-gebundenen Zucker-Bausteins mit dem Boronsäure-modifizierten Inhibitor über reversible Veresterung. Rechts ist ein Ausschnitt eines Strukturvorschlags der Verknüpfung in Protein-Umgebung dargestellt. Der Ausschnitt beschränkt sich auf den Inhibitor bis zum Serin-Rückgrat.

Die Strukturanalytik des beschriebenen Mehrkomponentensystems in Lösung erfolgte anhand struktureller Parameter, die NMR-spektroskopisch ermittelt wurden. Mittels Kristallisationsansätzen, Thermophorese und *Thermal-shift assays*, die in der pharmazeutischen Chemie im Arbeitskreis KLEBE durchgeführt wurden, konnte überprüft werden, ob eine Verknüpfung

Kurzzusammenfassung

stattgefunden hat, und wie die eingeführten Modifikationen die Affinität zum Protein und zu ATP beeinflussen.

Darüber hinaus wurde der Ansatz der dynamisch kovalenten Chemie (DCC) zusätzlich für die Zyklisierung von Peptiden mit ribopyranosylierten Aminosäuren und Boronsäuren genutzt, deren Umsetzung stets NMR-spektroskopisch verfolgt werden konnte. Weiterhin wurde, basierend auf den Arbeiten mit Boronsäuren, ein Biaryl-Aminosäure Baustein durch eine SUZUKI-MIYAURA-Reaktion synthetisiert. Der Einfluss dieser Aminosäure auf die Struktur des β -*hairpins* aus dem Protein Foldon wurde anschließend mittels NMR-Spektroskopie quantifiziert.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Romina Anna Kirschner und Armin Geyer.

Reversible boronic ester formation of ribopyranosylated Glycopeptides.

ChemistrySelect **2016**, *1*, 15, 4570-4576. DOI: 10.1002/slct.201601240

Romina Anna Kirschner, Janis Müller, Gerhard Klebe, Armin Geyer.

Substrate Analog Peptide Inhibitors - A Linkage between Boronic Acid & Sugar.

Peptides 2016 Proceedings Volume of the 34th EPS 4-9 Sep., Leipzig **2016**, 150-151.

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

Poster: “Substrate Analog Peptide Inhibitors - A Linkage between Boronic Acid & Sugar“
Kiel, 18th JCF-Frühjahrssymposium der GDCh, 16.-19. März **2016**.

Poster: “Substrate Analog Peptide Inhibitors - A Linkage between Boronic Acid & Sugar“
Leipzig, 34th European Peptide Symposium, 04.-09. September **2016**.

I. Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 D-Ribose | 3 |
| 1.2 Glykopeptide & -Proteine | 4 |
| 1.2.1 O- & N-Glykane | 9 |
| 1.2.2 Schutzgruppenstrategien für Glykosyl-Donoren & -Akzeptoren | 10 |
| 1.2.3 Glykosylierungsreaktionen | 13 |
| 1.2.3.1 O-Glykosylierung | 14 |
| 1.2.3.2 N-Glykosylierung | 16 |
| 1.2.3.3 S-Glykosylierung | 17 |
| 1.2.4 Glykopeptid/-protein Erkennung | 18 |
| 1.3 Eigenschaften von Boronsäuren und die damit verbundene Vielseitigkeit | 19 |
| 1.3.1 Anwendungsgebiete für Boronsäuren | 20 |
| 1.3.1.1 Boronsäuren als reversibel kovalent-bindende Zucker-Sensoren | 21 |
| 1.3.1.2 Enzyminhibitoren auf Basis von Boronsäuren | 24 |
| 1.4 Proteinkinase A | 27 |
| 1.4.1 Die katalytische Untereinheit der PKA | 29 |
| 1.4.2 Inhibitoren für die PKA | 30 |
| 1.4.3 Bisubstrat-Inhibitoren für die PKA | 32 |
| 1.5 Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie | 37 |
| 2. Aufgabenstellung | 43 |
| 3. Ergebnisse und Diskussion | 46 |
| 3.1 Synthese und Verwendung der glykosylierten Aminosäurebausteine | 46 |
| 3.1.1 Verwendung glykosylierter Aminosäuren in der Festphasenpeptidsynthese | 51 |
| 3.1.2 Boronsäureveresterung der Tetrapeptide | 52 |
| 3.1.3 Peptide mit mehreren RAS zur Boronsäureveresterung | 59 |
| 3.1.4 Titration der ribopyranosylierten Tetrapeptide mit 1,4-Phenyldiboronsäure | 63 |
| 3.1.5 Titrationsen der ribopyranosylierten Tetrapeptide mit trivalenten Metallen | 66 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.1.6 | Berechnung der Gleichgewichtskonstante der Veresterung zwischen Pyrenboronsäure und dem Tetrapeptid I-RbS-A-G in DMSO _{d6} | 69 |
| 3.1.7 | Veresterung zwischen Benzoboroxol und dem Dekapeptid in wässrigen Puffersystemen (pH = 7.5)..... | 71 |
| 3.1.8 | Konkurrenzexperiment der Veresterung zwischen dem Dekapeptid und Adenosin mit Phenylboronsäure und 3-Carboxyphenylboronsäure..... | 75 |
| 3.2 | Methoden der kovalent reversiblen Ligation..... | 77 |
| 3.3 | Synthese und Auswahl der modifizierten PKI-Sequenzen..... | 79 |
| 3.3.1 | Strategien für die Positionierung der RAS im Peptid..... | 90 |
| 3.4 | Synthese der Fasudil-Derivate..... | 93 |
| 3.5 | Ergebnisse aus der Kooperation mit der pharmazeutischen Chemie..... | 98 |
| 3.5.1 | Kristallisationsansätze der modifizierten PKI-Sequenzen..... | 98 |
| 3.5.2 | Methoden zur Affinitätsbestimmung..... | 99 |
| 3.5.2.1 | Thermal Shift Assay..... | 99 |
| 3.5.2.2 | Thermophorese Assay..... | 101 |
| 3.5.3 | Einbau der Adamantyl-Aminosäuren in die PKI-Sequenz..... | 103 |
| 3.6 | Weitere RAS-enthaltende Peptide..... | 106 |
| 3.6.1 | Einbau von 3-Carboxyphenylboronsäure in Peptidseitenketten zur Anbindung RAS-enthaltender Peptide..... | 108 |
| 3.7 | Natürlich vorkommende, glykosylierte Peptidsequenzen mit RAS-Mutation.. | 112 |
| 3.8 | Einbau von Boronsäuren & RAS in Peptide zur intramolekularen Zyklisierung an Testsystemen..... | 116 |
| 3.9 | Der β -hairpin des Foldons als Leitstruktur für die intramolekulare Zyklisierung mittels Boronsäureveresterung..... | 121 |
| 3.10 | Synthese von 4-Iod-Phe, 4-Borono-Phe und 4,4'-Biphenylalanin..... | 126 |
| 3.10.1 | Einbau der Phenylalanin Derivate in Leu-Enkephalin..... | 128 |
| 3.10.2 | Einbau der Phenylalanin Derivate in den β -hairpin des Foldons..... | 131 |
| 4. | Zusammenfassung und Ausblick..... | 138 |
| 5. | Summary and Outlook..... | 144 |
| 6. | Experimenteller Teil..... | 149 |
| 6.1 | Allgemeine Anmerkungen..... | 149 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------------|
| 6.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Festphasenpeptidsynthese..... | 152 |
| 6.2.1 Beladung des 2-Chlortritylchlorid-Harzes..... | 152 |
| 6.2.2 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe..... | 153 |
| 6.2.3 Kupplung der Aminosäuren..... | 153 |
| 6.2.4 Abspaltung der OAc-Schutzgruppe an RAS-Bausteinen..... | 153 |
| 6.2.5 Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen simultan zur Peptid- Abspaltung vom Harz..... | 154 |
| 6.2.6 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese von Peptiden..... | 154 |
| 6.2.7 Oxidation von Cystein-haltigen Peptiden..... | 155 |
| 6.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Boronsäureveresterung im NMR..... | 155 |
| 6.4 Synthese der Aminosäure-Bausteine und Verwendung in Tetrapeptiden..... | 156 |
| 6.5 Synthese weiterer Peptide mit glykosylierten Bausteinen..... | 187 |
| 6.6 Synthese der PKI-Peptide mit glykosylierten Bausteinen..... | 202 |
| 6.7 Synthese der PKI-Peptide mit Adamantyl-Aminosäuren..... | 226 |
| 6.8 Synthese der Fasudil-Derivate..... | 238 |
| 6.9 Synthese von Phenylalanin-Derivaten und ihr Einsatz in der SPPS..... | 262 |
| 6.10 Einbau glykosylierter Bausteine in bekannte Peptidstrukturen des Arbeits- kreises..... | 286 |
| 6.11 Einbau der RAS-Bausteine in natürlich vorkommende, glykosylierte Peptidsequenzen..... | 294 |
| 6.12 Einbau von Boronsäuren in Peptide - Terminal im <i>backbone</i> oder via Seitenketten-Kupplung..... | 300 |
| 7. Quellen..... | 324 |
| 8. Anhang..... | 338 |

II. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 2-CTC | 2-Chlorotritylchlorid |
| 3CB | 3-Carboxyphenylboronsäure |
| Å | Angström |
| A β | Amyloid β -Peptid |
| abs. | absolut |
| AcCl | Acetylchlorid |
| arom. | aromatisch |
| ber. | berechnet |
| BF ₃ x Et ₂ O | Bortrifluorid-Diethyletherat |
| (Boc) ₂ O | Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat |
| Boc | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl |
| bs | bereites Singulett (NMR) |
| Bz | Benzoyl- |
| °C | Grad Celsius |
| c | Konzentration |
| Cbz | Benzyloxycarbonyl- |
| CD | <i>Circular Dichroism</i> |
| COSY | <i>CORrelated SpectroscopY</i> |
| δ | chemische Verschiebung |
| d | Dublett (NMR), Tage, Durchmesser |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| DCM | Dichlormethan |
| dd | Doppeldublett (NMR) |
| ddd | doppeltes Dublett vom Dublett (NMR) |
| dest. | destilliert |
| DIPEA | Di- <i>iso</i> -propylethylamin |
| DMAP | <i>N,N</i> -Dimethylpyridin-4-amin |
| DMF | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMSO-d ₆ | deutერიertes Dimethylsulfoxid |
| dppf | 1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocen |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |

Abkürzungen

| | |
|-------------------|---|
| Et ₂ O | Diethylether |
| eq | Äquivalent |
| ESI | Elektrospray-Ionisation |
| EtOAc | Ethylacetat |
| Fmoc- | 9-Fluorenylmethoxycarbonyl- |
| g | Gramm |
| gef. | gefunden |
| ges. | gesättigt |
| h | Stunden |
| HBTU | <i>O</i> -Benzotriazol- <i>N,N,N,N</i> -tetramethyluronium- hexafluorophosphat |
| HMBC | <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> |
| HOBt | 1-Hydroxybenzotriazol |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| HRMS | <i>High Resolution Mass Spectroscopy</i> |
| HSQC | <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> |
| HV | Hochvakuum |
| Hz | Hertz |
| IR | Infrarot |
| IUPAC | <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> |
| <i>J</i> | Spin-Spin Kopplung |
| K | Kelvin |
| K _{ass} | Gleichgewichtskonstante |
| konz. | konzentriert |
| L | Liter |
| M | Molarität |
| M | Molare Masse |
| m | Multiplett (NMR) |
| MeCN | Acetonitril |
| MeOH | Methanol |
| mg | Milligramm |
| MHz | Megahertz |
| mL | Milliliter |

Abkürzungen

| | |
|----------------|--|
| mmol | Millimol |
| n | Stoffmenge |
| NaOMe | Natriummethanolat |
| NMM | N-Methylmorpholin |
| NMR | <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> |
| NOE | <i>Nuclear Overhauser Effect</i> |
| NOESY | <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i> |
| Pbf | 2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl |
| oBB | <i>o</i> -Hydroxymethyl Phenylboronsäure (Benzoboroxol) |
| PDB | Proteindatenbank, Phenyldiboronsäure |
| PET | Positronen-Emissions-Tomographie |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKI | Proteinkinase Inhibitor |
| ppb | <i>parts per billion</i> |
| ppm | <i>parts per million</i> |
| q | Quartett (NMR) |
| quint. | Quintett (NMR) |
| R _f | <i>Ratio of fronts</i> |
| RAS | Ribopyranosylierte Aminosäure |
| ROE | <i>Rotating frame nuclear Overhauser Effect</i> |
| ROESY | <i>Rotating frame nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i> |
| RP | <i>Reversed Phase</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Singulett (NMR), Sekunde |
| SPPS | <i>Solid Phase Peptide Synthesis</i> |
| sx | Sextett (NMR) |
| t | Triplett (NMR) |
| T | Temperatur |
| <i>t</i> Bu | <i>Tert</i> -Butyl |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| TIPS | Tri- <i>iso</i> -propylsilan |
| TMSOTf | Trimethylsilyltrifluormethansulfonat |

Abkürzungen

| | |
|----------------|---|
| TOCSY | <i>TOtal Correlation SpectroscopY</i> |
| t _R | Retentionszeit |
| TSP | Natrium-(Trimethylsilyl)-propionat-d ₄ |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volumen |
| Vis | <i>visible</i> |
| WATERGATE | <i>WATER suppression by GrAdient Tailoired Excitation</i> |
| Xaa | Beliebige (proteinogene/nicht-proteinogene) Aminosäure |

Übersicht der proteinogenen und der darüber hinaus in dieser Arbeit synthetisierten L-Aminosäuren. Die Ein- und Drei-Buchstabencodes sind für die proteinogenen Aminosäuren angegeben, die synthetisierten Derivate erhielten lediglich neue, passende Drei-Buchstabencodes. Für die Festphasenpeptidsynthese benötigte Seitenketten-Schutzgruppen sind in Klammern aufgeführt.

| | | |
|-------------------|---|----------------|
| Ala | A | Alanin |
| Arg(Pbf) | R | Arginin |
| Asn(Trt) | N | Asparagin |
| Asp(<i>t</i> Bu) | D | Asparaginsäure |
| Cit | | Citrullin |
| Cys(Trt) | C | Cystein |
| Gln(Trt) | Q | Glutamin |
| Glu(<i>t</i> Bu) | E | Glutaminsäure |
| Gly | G | Glycin |
| His(Trt) | H | Histidin |
| Ile | I | Isoleucin |
| Leu | L | Leucin |
| Lys(Boc) | K | Lysin |
| Phe | F | Phenylalanin |
| Pro | P | Prolin |

Abkürzungen

| | | |
|-------------------|---|---|
| Ser(<i>t</i> Bu) | S | Serin |
| Thr(<i>t</i> Bu) | T | Threonin |
| Trp(Boc) | W | Tryptophan |
| Tyr(<i>t</i> Bu) | Y | Tyrosin |
| Val | V | Valin |
| 4IF | | 4-Iod-Phenylalanin |
| Bip | | 4,4'-Biphenylalanin |
| Bpa | | 4-Borono-Phenylalanin |
| BLy | | <i>N</i> ^E -3-Phenylboronsäure-Lysin |
| FtS | | Serin- β -D-Fructopyranose-tetrabenzoat |
| Hyp | | Hydroxyprolin |
| Hyl | | Hydroxylysin |
| Hot=Tap | | Hydroxythreonin=Thiaprolin |
| pen | | D-Penicillamin |
| Tle | | <i>tert</i> -Leucin |
| RbS | | Serin- β -D-Ribopyranose-triacetat |
| RbC | | Cystein- β -D-Ribopyranose-triacetat |
| RbT | | Threonin- β -D-Ribopyranose-triacetat |
| RbY | | Tyrosin- β -D-Ribopyranose-triacetat |
| RHp | | Hydroxyprolin- β -D-Ribopyranose-triacetat |
| Rpa | | D-Penicillamin- β -D-Ribopyranose-triacetat |
| RfS | | Serin- β -D-Ribofuranose-triacetat |

1. Einleitung

Polyole ermöglichen aufgrund ihrer hohen strukturellen und stereochemischen Variabilität durch die Anordnung der Bindungsmotive (Hydroxygruppen) ein vielfältiges Reaktionsspektrum für die reversible kovalente Chemie. Im Fokus dieser Arbeit steht die Fähigkeit eines bestimmten Polyols - der Ribopyranose - über das enthaltene *ax-äq-ax*-Motiv Boronsäuren sehr stark binden zu können. Ribose gehört zur Klasse der Kohlenhydrate, welche eine wichtige Rolle für lebende Organismen spielen, da sie, nicht zuletzt wegen ihrer außerordentlich großen strukturellen Vielfalt, eine Vielzahl an Aufgaben innehaben. Sie zählen zu den Hauptenergiequellen für Lebewesen (Stärke und Glykogen) und sind der Grundbaustein für z.B. DNA/RNA, Glykoproteine, -lipide und ATP.^[1] In Form von Cellulose üben Saccharide in der Natur großen Einfluss auf die strukturelle Rigidität aus.^[2] Weiterhin ermöglicht die Variabilität ihrer Struktur eine äußerst effiziente Codierung von Informationen, die die darauf basierenden Möglichkeiten der Aminosäuren und Nukleotide bei weitem übersteigt. Ein Beispiel dafür ist die Kombination zweier Monosaccharide, wodurch bereits 20 verschiedene, strukturisomere Disaccharide gebildet werden können, im Gegensatz zur Verknüpfung zweier Aminosäuren, die lediglich zwei Möglichkeiten bietet.^[3] Mit der genannten Komplexität geht jedoch auch die weitaus schwierigere Entschlüsselung des „genetischen Codes“ der Kohlenhydrate einher. Mittels drei verschiedener Parameter können Kohlenhydrate ihre Komplexität aufbauen. Zum einen ist eine unterschiedliche Anordnung der Hydroxylgruppen innerhalb der Monomere möglich, die wiederum an verschiedenen Stellen zur Verknüpfung mit weiteren Sacchariden genutzt werden, sodass 1,2-, 1,3-, 1,4- und 1,6- glykosidische Bindungen entstehen können. Weiterhin bietet die jeweilige anomere Konfiguration einen dritten Parameter für die Erzeugung struktureller Vielfalt.^[4] Dass Saccharide innerhalb von Glykoproteinen einen großen Einfluss auf den Informationstransport, Zelloberflächen-Erkennung, -Adhäsion und -Durchlässigkeit, das Auslösen einer Immunantwort und die Stabilität gegenüber Proteolyse haben, hat diesen im Laufe der Jahre einen Zuwachs des Stellenwertes verschafft.^[5] Daraus resultierend hat das Forschungsinteresse in allen Teilbereichen der Zuckerchemie zugenommen - sei es auf dem Gebiet der Synthese von Kohlenhydrat-Rezeptoren für den potentiellen Einsatz als Medikament, für den Transport durch Zellmembranen oder als Sensoren.^[6]

Verschiedene Analytikmethoden ermöglichen die Identifizierung und Quantifizierung von Kohlenhydraten bzw. den enthaltenen Untereinheiten - ihren Monomeren. Während zahlreiche Nachweismöglichkeiten auf Basis von nicht-kovalenten Wechselwirkungen mit synthetischen

Saccharid-Rezeptoren existieren, welche z.B. auf Calixaren-Systemen,^[7] Phosphonaten bzw. Phosphaten,^[8,9] diversen bi-, tri- und macrozyklischen Systemen^[10-12] und metallhaltigen Systemen^[13-16] beruhen, beschäftigt sich diese Arbeit mit Analytikmethoden, die auf kovalenten Wechselwirkungen basieren. Bereits in den späten 1950er Jahren fanden die Arbeitsgruppen um LORAND und EDWARDS heraus, dass Boronsäure basierende Rezeptoren für die Erkennung von Zuckern verwendet werden können und die jeweilige Affinität zueinander anhand einer Änderung des pH-Werts der wässrigen Umgebung messbar ist.^[17] Mithilfe der Kenntnis, dass Borsäuren bzw. Boronsäuren mit Sacchariden zum entsprechenden Ester komplexieren, konnten z.B. verschiedene Boronsäuren als Sensoren zur selektiven Erkennung von Sacchariden synthetisiert werden (z.B. Glykoprotein Erkennung: Abb. 1).^[18-20]

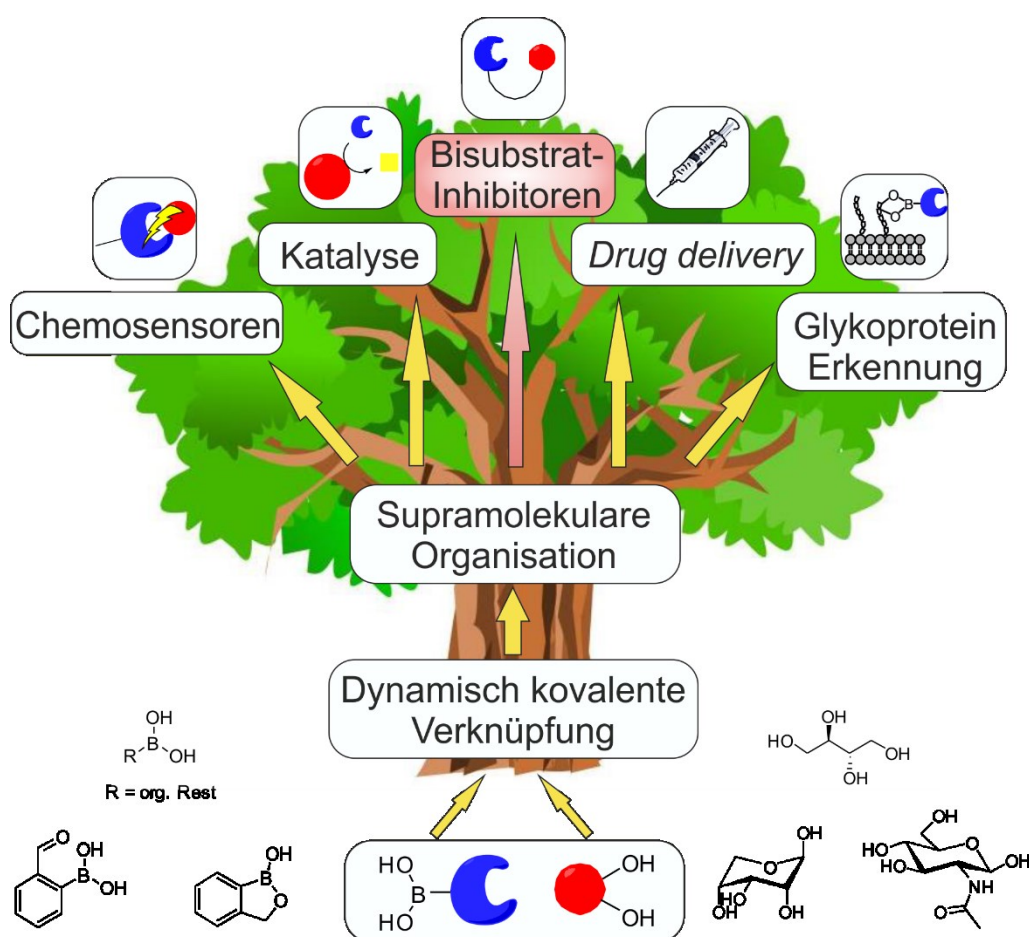
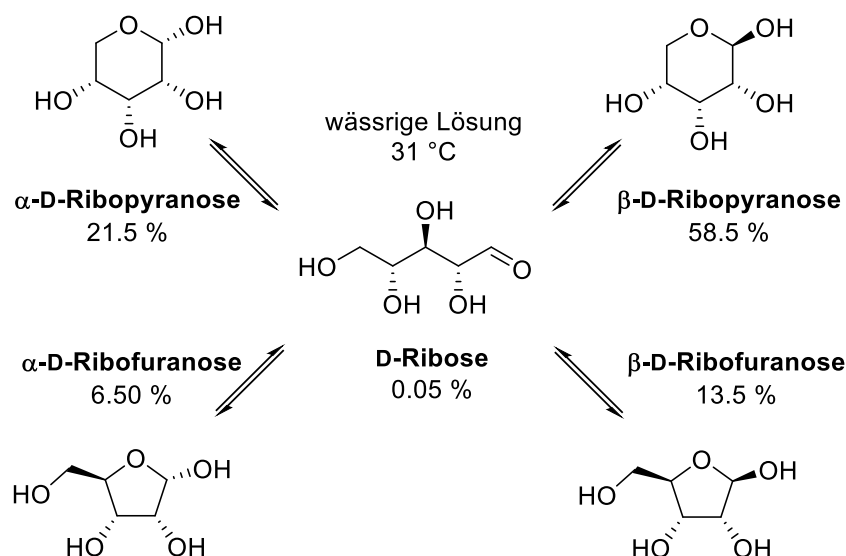


Abbildung 1. Die kovalent reversible Veresterung von Boronsäuren mit Diolen hat zahlreiche Anwendungen in verschiedenen Teilbereichen der supramolekularen Chemie.^[21] Die beiden dominierenden Einsatzgebiete sind dabei die Glykoprotein-Erkennung auf Zelloberflächen und der Einsatz als Chemosensoren, die zumeist mit Fluoreszenzmarkern versehen sind. Auch in der Katalyse findet dieses System Verwendung, sowie bei der Synthese neuartiger Inhibitoren und Medikamente. Die hier untersuchte Methode der Bisubstrat-Inhibitoren ist rot hervorgehoben.

Weiterhin sollen Boronsäuren, neben der Identifizierung und Markierung von Sacchariden, auch zur Modifizierung und Inhibierung dieser, verwendet werden. Ziel dieses Forschungszweigs ist nicht zuletzt das Finden neuer Targets zur Bekämpfung von Krankheiten, dessen Angriffspunkte die glykosylierten Einheiten von Peptiden innerhalb und außerhalb der Körperzellen sind.^[22] In dieser Arbeit soll die kovalent reversible Esterbindung zwischen Boronsäuren und Sacchariden in einem ähnlichen Zusammenhang untersucht werden - die Verknüpfung von Peptiden und Untersuchungen auf Stabilität und Affinität liegen im Fokus.

1.1 D-Ribose

Die wohl am häufigsten in lebenden Organismen vorkommenden Saccharide sind Glucose, Fructose, Galactose und dessen Polymere und Derivate. In dieser Arbeit wird jedoch der Fokus auf ein anderes Monosaccharid gelegt - die D-Ribose mit ihrem *ax-äq-ax*-Bindungsmotiv der Hydroxygruppen (2,3,4-OH). Bei der D-Ribose handelt es sich um eine Aldopentose, da das Grundgerüst aus fünf Kohlenstoffatomen besteht (=Pentose) und die Zyklisierung über eine Aldehyd-Funktion stattfindet (=Aldose). Durch Halbacetalbildung in wässriger Lösung kann sich aus der offenkettigen D-Ribose der Fünf- bzw. Sechsring mit den jeweiligen α - und β -Anomeren bilden (Schema 1).



Schema 1. Vorkommen von D-Ribose in wässriger Lösung bei 31 °C. Das Konformeren-Verhältnis ist prozentual aufgelistet - die β -D-Ribopyranose liegt aufgrund der günstigsten sterischen Positionierung der Hydroxygruppen als Hauptkonformer vor.^[23]

Einleitung

Die wohl bekannteste Darstellungsform der D-Ribose ist die β -D-Ribofuranose, da sie in dieser Form Bestandteil des Ribonukleinsäure-Rückgrats ist, und über den C1-Kohlenstoff eine Nukleobase und über den C5-Kohlenstoff einen Phosphatrest trägt. Darüber hinaus spielt die β -D-Ribofuranose eine wichtige Rolle als Energieträger - sie ist ebenfalls Bestandteil von Adenosinmono-, di- und triphosphat (ATP, ADP, AMP) sowie von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH).^[24] In der Medizin und Lebensmittelchemie findet D-Ribose Anwendung als Nahrungsergänzungsmittel, z.B. für die schnellere Regeneration der ATP-Speicher nach dem Training im anaeroben Bereich und wird ebenfalls als Ausgangsstoff für die Synthese von Riboflavin, Steroiden, Terpenoiden und Vitamin D verwendet (Abb. 2).^[25,26] Medikamentöse Anwendungen liegen im Bereich der Prophylaxe gegen Migräne und die D-Ribose wird in Form des Purin-Derivats Methyl-5'-inosinmonophosphat als abschwächendes Mittel für die immun-supprimierende Wirkung des HI-Virus eingesetzt.

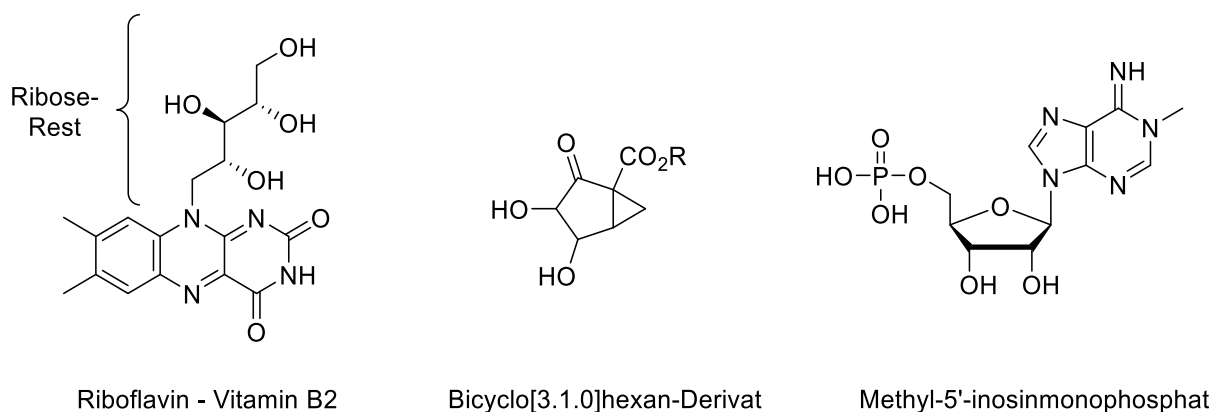


Abbildung 2. Darstellung Ribose-enthaltender Verbindungen aus den Bereichen der Lebensmittelchemie und der Medizin. Riboflavin dient u. a. als Nahrungsergänzungsmittel, das Bicyclo[3.1.0]hexan-Derivat wird als Edukt zur Synthese von Steroiden, Terpenoiden und Vitamin D eingesetzt und das Methyl-5'-inosinmonophosphat wird HIV-Patienten verabreicht.^[25,26]

Aufgrund der Verwendung von D-Ribose in den genannten Gebieten, wird sich hinter dem bereits breiten Anwendungsspektrum noch weiteres Potential erhofft, weshalb im Zuge dieser Arbeit mit einem anderen Konformer der D-Ribose, der pyranoiden Form, gearbeitet werden soll.

1.2 Glykopeptide und -proteine

Wie bereits erwähnt, spielen Kohlenhydrate neben Proteinen, DNA und Lipiden eine bedeutende Rolle bei der Regulierung und Steuerung biologischer Prozesse. Zwei Charakteristika unterscheiden Kohlenhydrate jedoch von den anderen Klassen: Die Möglichkeit der unterschiedlichen Verknüpfungen der einzelnen Monomere miteinander und der hohe Grad an Verzweigung. Diese weitreichende Variabilität kann über eine Anbindung der Kohlenhydrate an Proteine und Lipide auf die Zellmembran übertragen werden und dient biologischen Prozessen wie der Immunabwehr gegen virale und parasitäre Erreger, der Entzündungshemmung und dem Zellwachstum, -adhäsion und -vermehrung (Abb. 3).^[4] Neben den genannten, zellschützenden Funktionen gegenüber Strukturverlust oder Zellabbau (Proteolyse) übernehmen Oligosaccharide auch Aufgaben, die der Zellerkennung dienen und somit einer Markerfunktion gleichkommt. Allerdings werden fehlende oder falsche Oligosaccharide an Proteinen auch als Ursache für eine Vielzahl an Krankheiten angesehen, denn einhergehend mit den vielen selektiven Funktionen, führen Codierungsfehler innerhalb der Oligosaccharide zum Verlust der gezielten Durchführung der genannten Aufgaben.^[6]

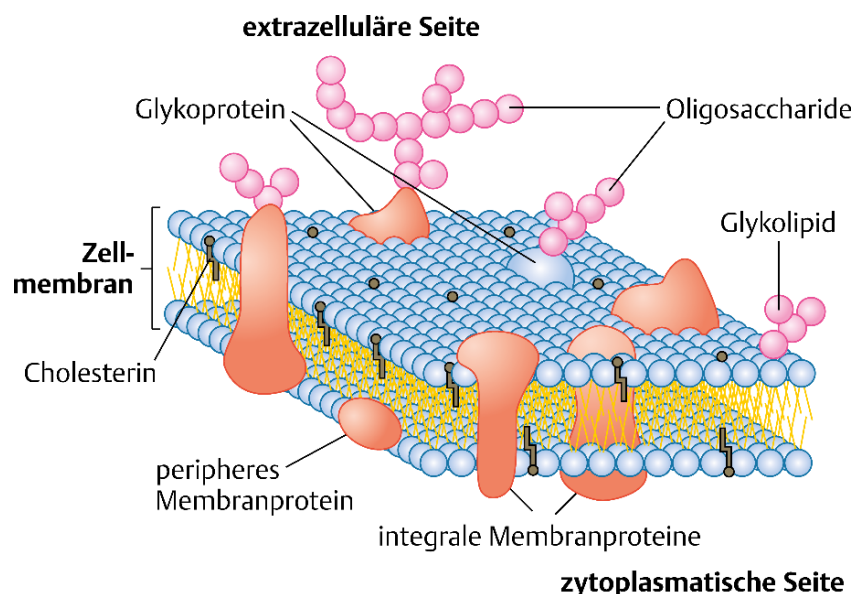


Abbildung 3. Aufbau der Zellmembran.^[27] Glykoproteine und -lipide sind als solche gekennzeichnet und tragen sogenannte „Zuckerbäumchen“. Sie liegen zumeist nur auf der extrazellulären Seite der Membran.

Bei den meisten Proteinen findet die Kohlenhydratanbindung posttranslational im endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat statt und wird durch die Modifikation von ribosomalen Proteinen mittels Glykosyltransferasen erreicht (Abb. 4).^[28]

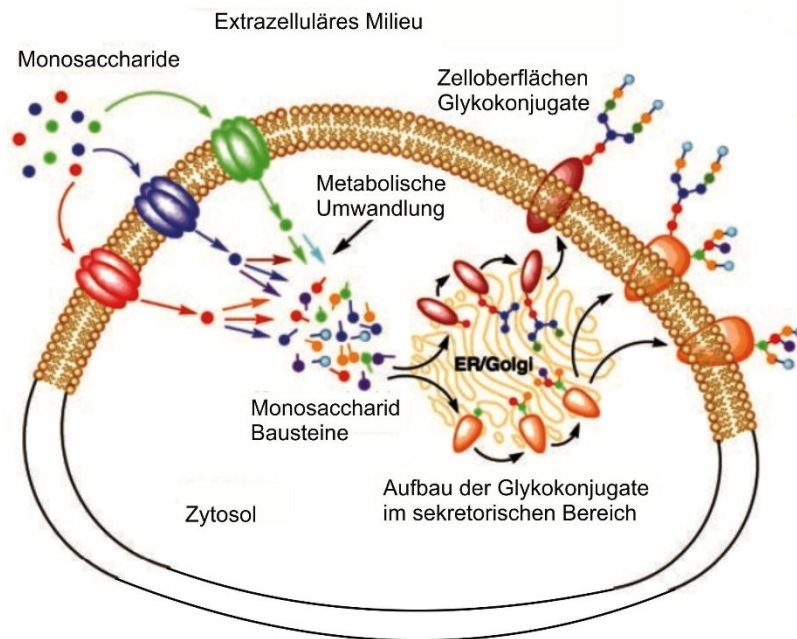


Abbildung 4. Darstellung der Glykoprotein-Biosynthese.^[29] Monosaccharide aus dem extra-zellulären Raum werden über spezielle Membrankanäle in die Zelle aufgenommen und dort in die entsprechenden Bausteine für die Biosynthese umgewandelt. Innerhalb des sekretorischen Bereichs im ER bzw. Golgi-Apparat erfolgt die Proteinanbindung mittels Glykosyltransferasen. Anschließend können die exprimierten Glykoproteine in die Zellmembran eingelagert werden, um dort ihre entsprechende Tätigkeit aufzunehmen.

In der Regel besteht die Oligosaccharid-Komponente aus weniger als fünfzehn, oftmals verzweigten Monomeren, welche wiederum aus *N*-Acetylhexaminen und Hexosen zusammengesetzt sind. Generell kommen in Glykopeptiden nur neun verschiedene Zuckerreste vor - Glukose (Glc), Galaktose (Gal), Mannose (Man), Arabinose (Ara), Xylose (Xyl), Fucose (Fuc), *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc), *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und Sialinsäure (Sial), die über fünf verschiedene Aminosäuren (Serin, Threonin, Tyrosin, Hydroxylysin/-prolin und Asparagin) *O*- oder *N*-glykosidisch gebunden sind (Abb. 5).^[30]

Einleitung

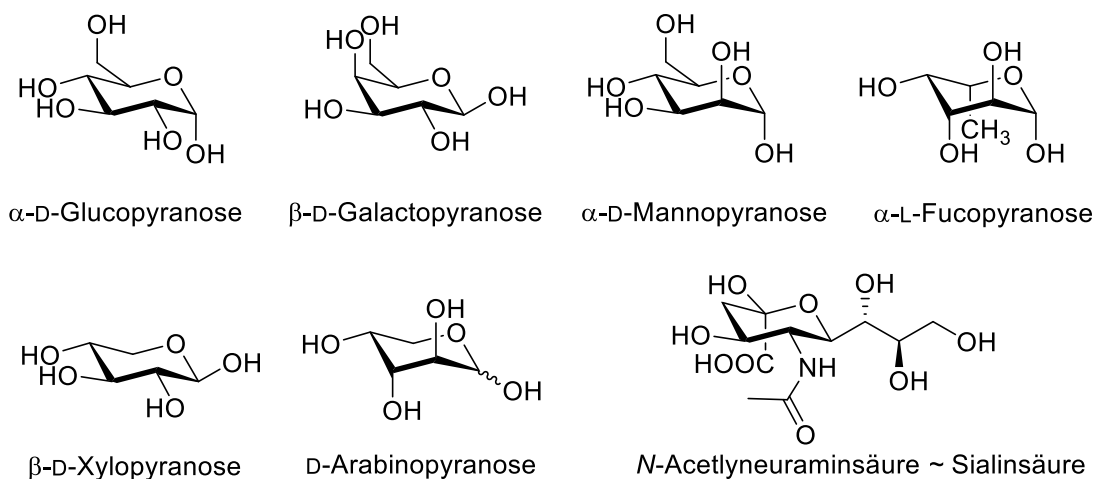


Abbildung 5. Darstellung der sieben Saccharid-Grundkörper, die in Glykoproteinen vorkommen. Die beiden *N*-acetylierten Zucker GalNAc und GlcNAc werden entsprechend von Gal und Glc abgeleitet und tragen eine *N*-Acetylgruppe statt einer Hydroxygruppe an Position 2. Sialinsäure gilt als Oberbegriff für die *N*- und *O*-Derivate der Neuraminsäure, weshalb *N*-Acetylneuraminsäure (NeuNAc) als Beispiel abgebildet ist.

In Anbetracht der vielen Funktionen, die eine Anbindung von Sacchariden an Peptide, Proteine und Lipide schafft, wird die Erforschung diverser Methoden zur Glykosylierung bereits seit langer Zeit betrieben.^[28,31,32] Das Anbinden von Sacchariden kann dabei durch unterschiedliche, teils kombinierbare Prozesse, wie z.B. chemische, enzymatische und molekularbiologische Methoden, erfolgen.^[33] Eine generelle Übersicht über mögliche retrosynthetische Ansätze für den Aufbau von Glykoproteinen ist in Abbildung 6 dargestellt. Diese beinhaltet vier verschiedene Schnittstellen, hinter denen literaturbekannte Synthesemethoden stehen.

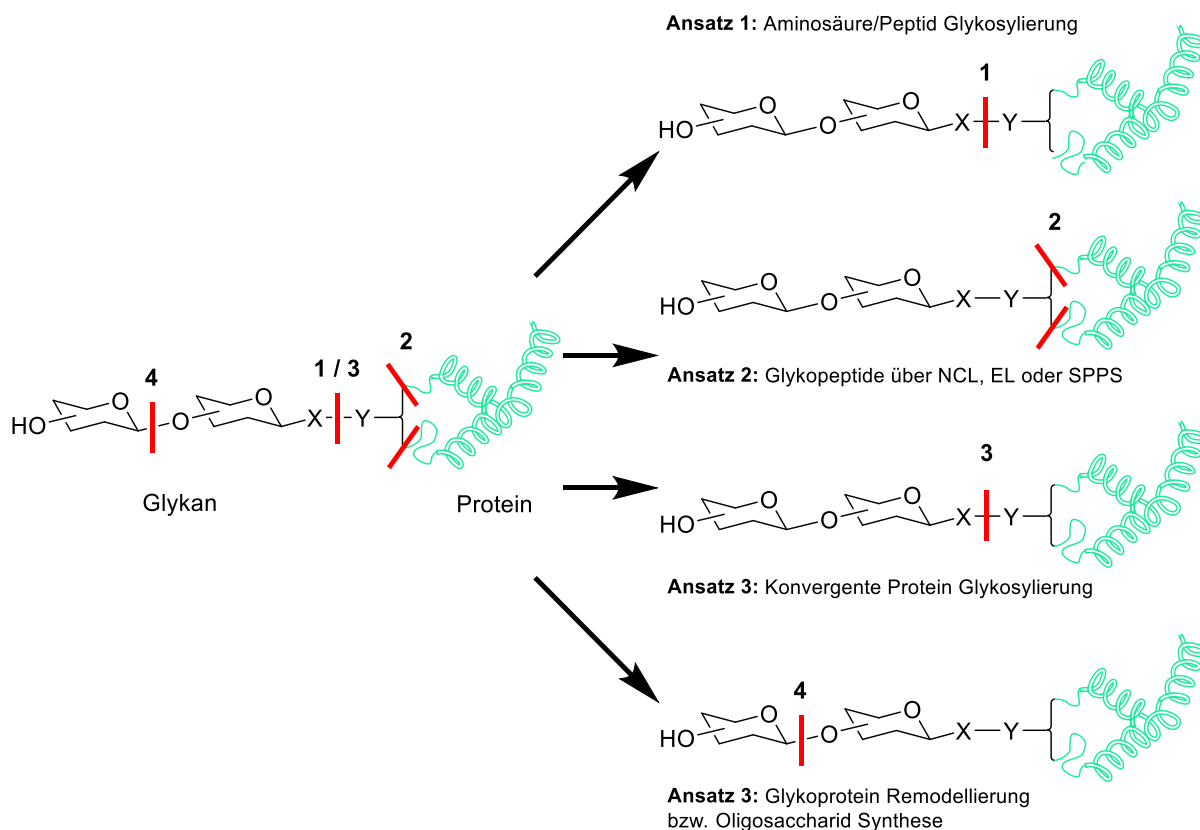


Abbildung 6. Retrosynthetische Darstellung eines Glykoproteins. Ansatz 1 beruht auf dem linearen Einbau von glykosylierten Aminosäuren in Form von entsprechend geschützten Bausteinen z.B. durch SPPS.^[34] Der zweite Ansatz beinhaltet den Einbau von Glykopeptiden ins Peptid Rückgrat über SPPS oder Ligationsmethoden wie NCL oder EL.^[35,36] Ansatz 3 bezieht sich auf das Einbringen von Zuckern in bereits bestehende Peptidsequenzen über geeignete funktionelle Gruppen. Ein möglicher Syntheseweg wurde z.B. von LANSBURY et al. vorgeschlagen und beinhaltet die Kupplung von Glykosylaminen an Aminosäuren mit einer Carboxyl-Funktion in der Seitenkette.^[37] Nachteil dieses Ansatzes ist, dass er nicht zu *O*-verknüpften Glykopeptiden führt. Im letzten Ansatz werden die Oligosaccharide in Glykoproteine über die sogenannte *Remodeling*-Methode durch entsprechende Enzyme gegen andere Saccharide transglykosyliert. Mittels dieser Methode konnten TAKEGAWA et al. verschiedene Funktionen auf die Ribonuklease-B übertragen.^[38]

Da in dieser Arbeit nur der erste Ansatz aus Abbildung 6 behandelt wird, erfolgt in den anschließenden Kapiteln eine genauere Beschreibung dieses Ansatzes und für die anderen Methoden sei auf die zuvor genannten Quellen verwiesen.

1.2.1 O- und N-Glykane

Wie bereits erwähnt, gibt es zwei Möglichkeiten Aminosäuren mit Sacchariden zu verknüpfen. Eine Verknüpfungsmethode kann über die glykosidische Bindung des Sauerstoffs von Serin, Threonin, Tyrosin oder Hydroxylysin/-prolin an eine Hydroxyl Gruppe des Zuckers unter Erhalt der O-verknüpften Glykane erfolgen. Die andere Anbindung wird über den Stickstoff der Seitenkette von Asparagin geschaffen und liefert entsprechend N-verknüpfte Glykane. Ein Überblick über ihre Funktionen im Organismus ist in Abbildung 7 dargestellt.^[34,39-41] Aus Gründen der Vollständigkeit sollten auch mögliche S-Verknüpfungen erwähnt werden, die durch Glykosylierung mit Cystein erhalten werden können, allerdings kommt diese Art von Glykanen nur sehr selten in lebenden Organismen vor.^[42-44]

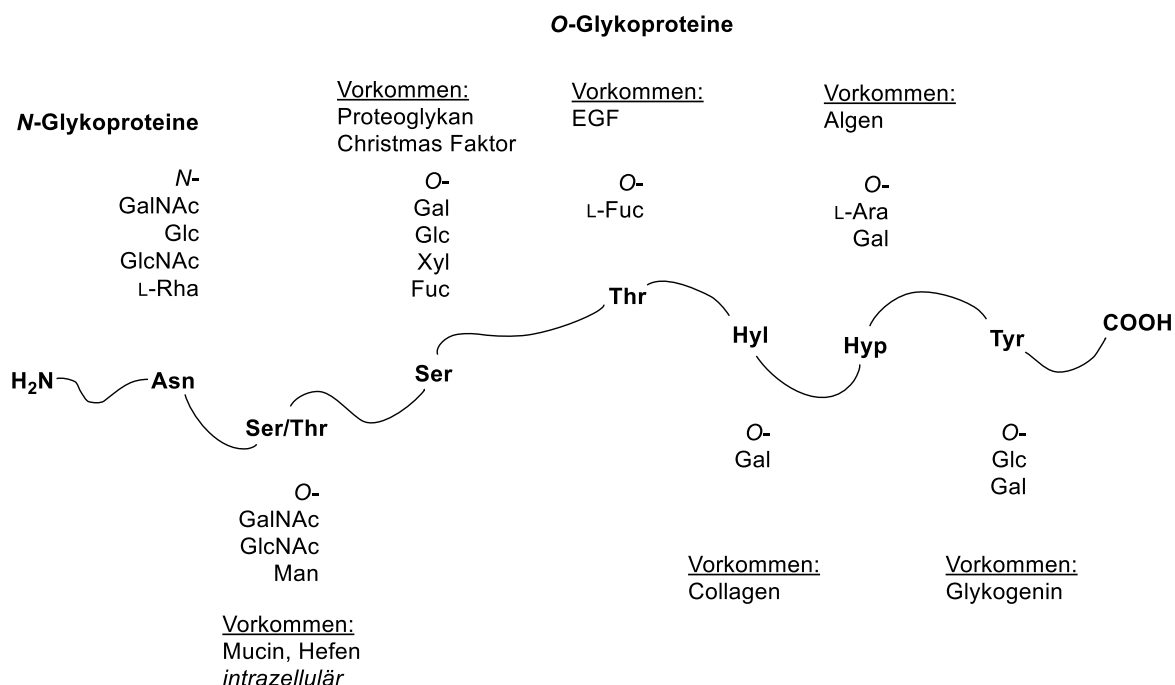


Abbildung 7. Aufgliederung bekannter N- und O-Glykoproteine und ihre Wirkungsorte. Während N-Glykoproteine ein sehr weitreichendes Vorkommen bei einfacherem Aufbau haben, finden sich O-Glykoproteine des Serins mit den Zuckern Gal, Glc, Xyl und Fuc primär in der Zellmembran und Granula tierischen Gewebes (Proteoglykan) oder als Gerinnungsfaktor in Serinproteasen (Christmas Faktor). Threonin in Verbindung mit Fucose tritt im epidermalen Wachstumsfaktor Protein (EGF) auf und dient als Signalmolekül für die Einleitung der Mitose.^[41]

Der einfachere strukturelle Aufbau von N-Glykosiden gegenüber O-Glykosiden wird daran erkenntlich, dass bei N-Glykosiden lediglich die terminalen Mannosen, die auf das sogenannte „Core-Pentasaccharid“ folgen, mit Verzweigungen durch andere Saccharide versehen werden können. Demgegenüber kommen die Oligosaccharidstrukturen in O-Glykosiden ohne

vorgegebene *Core*-Strukturen aus und können ihre Komplexität bereits ab dem ersten Zuckerbaustein aufbauen. Einige Beispiele für *O*- und *N*-Glykoside sind in Abbildung 8 aufgeführt.^[28]

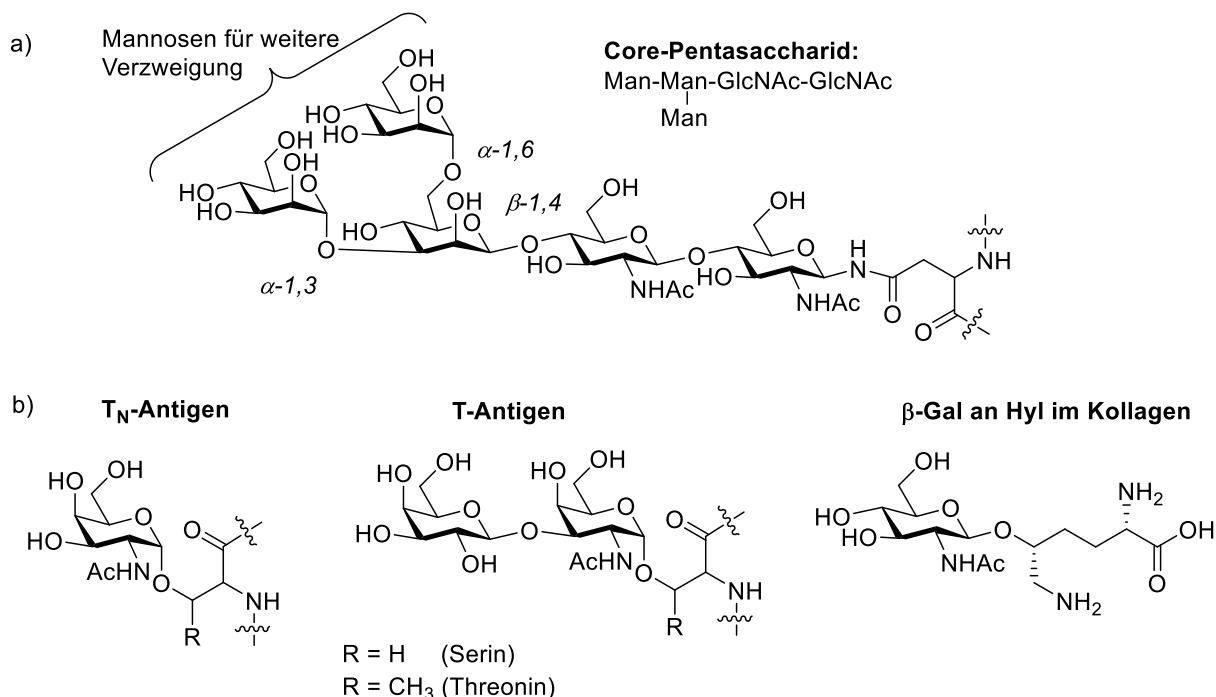


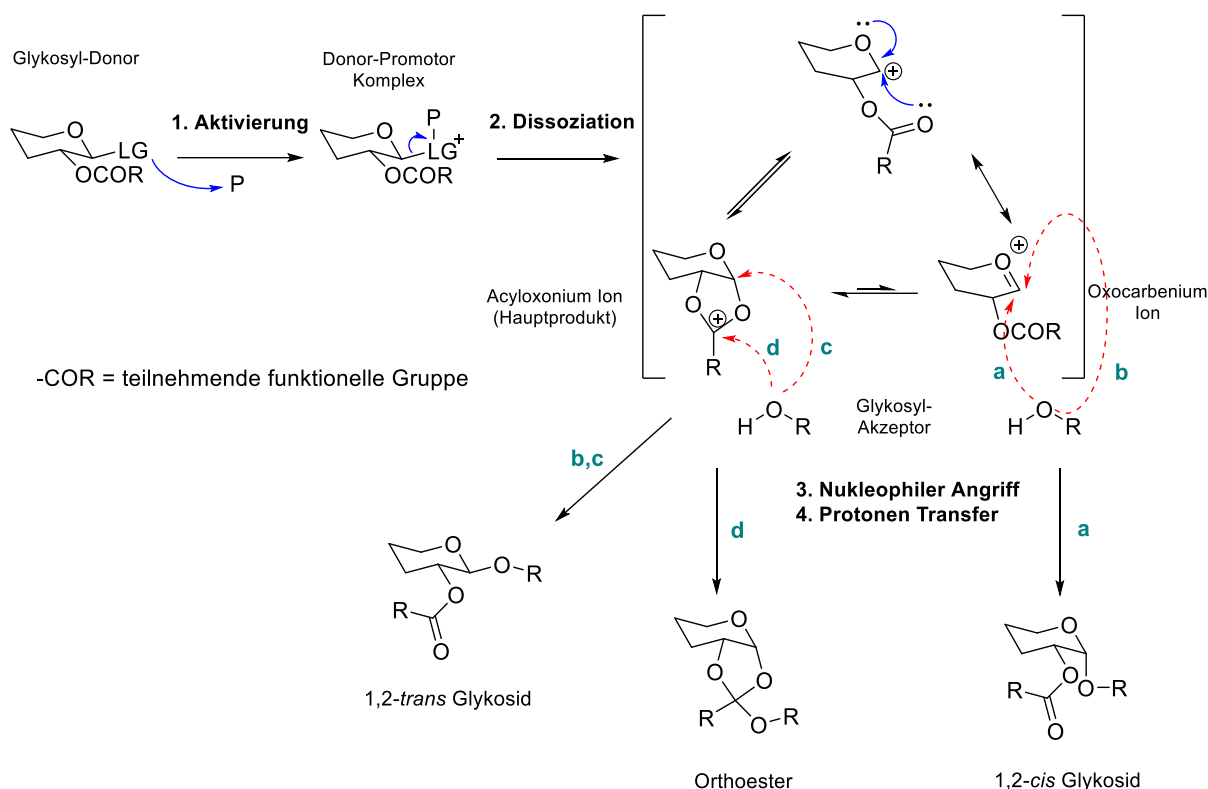
Abbildung 8. Beispiele für *O*- und *N*-Glykanstrukturen. a) Darstellung eines Core-Pentasaccharids als Grundgerüst für *N*-Glykane. Auf zwei GlcNAc-Moleküle folgt eine β -1,4-verknüpfte Mannose, die wiederum über α -1,3 und α -1,6 Verknüpfung je ein weiteres Mannose-Molekül trägt. Die beiden terminalen Mannose-Moleküle stehen für die Verknüpfung mit weiteren Sacchariden zur Verfügung. b) Zu den *O*-Glykanen gehören zum Beispiel T_N-Antigene, T-Antigene und Hydroxylysin verknüpft mit Galactose, wie sie in Kollagenen vorkommen.^[45,46]

1.2.2 Schutzgruppenstrategien für Glykosyl-Donoren und -Akzeptoren

Für die meisten gängigen Glykosylierungsreaktionen ist eine geeignete Schutzgruppen-Strategie erforderlich, da sowohl Glykosyl-Donor als auch -Akzeptor über viele funktionelle Gruppen verfügen, die die Reaktion beeinträchtigen könnten. Bei den entsprechenden Saccharid-Bausteinen bietet sich die Schützung der Hydroxy-Gruppen als Ester und Ether an. Gängige Schutzgruppen sind Benzoyl-, Acetyl-, Benzyl- und Silyl-Schutzgruppen.^[41,47] Die beliebteste Schutzgruppe ist die Acetyl-Schutzgruppe, da diese zum einen die *O*-glykosidische Bindung zum jeweiligen Glykosyl-Akzeptor während der Abspaltung vom Harz mit TFA stabilisiert und zum anderen sehr leicht unter milden basischen Bedingungen, ohne eine Epimerisierung der Aminosäure, entfernt werden kann. Darüber hinaus hat diese, an Position 2

des Zuckers befindlich (2-*O*-Acyl), eine steuernde Funktion in Bezug auf das Anomerenverhältnis der sich bildenden glykosidischen Bindung, sodass die 1,2-*trans*-Glykosylierung bevorzugt stattfindet.^[47,48] Die Aminosäuren benötigen zumeist nur am *N*-Terminus eine Schutzgruppe (Ser, Thr, Tyr, Cys, Hyp),^[49,50] deren Entschützung unter Bedingungen stattfinden muss, die nicht eine Spaltung der glykosidischen Bindung zur Folge hätte. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich die Boc-Schutzgruppe hierfür nicht eignet, da diese während der Glykosylierungsreaktion teilweise hydrolysiert wird und somit ungeschützte Aminosäure entsteht, wodurch Nebenreaktionen auftreten. Zusätzlich können die, zur Boc-Abspaltung benötigten, sauren Bedingungen zur Anomerisierung oder Spaltung der glykosidischen Bindung führen.^[51,52] Stattdessen findet häufig die Fmoc-Schutzgruppe Verwendung, weil die Abspaltbedingungen nicht über den milden basischen Bereich hinausgehen und somit keine Gefahr der β -Eliminierung besteht, was bei Einsatz von starken Basen mit *O*-Glykopeptiden häufig beobachtet wird.^[48,51] Sofern der *C*-Terminus einer Schutzgruppe bedarf, wird zumeist ein Pbf-Ester eingeführt, da dieser den Glykosylierungsbedingungen unter Lewis-Säure Katalyse standhält und stabil gegenüber *O*-Nukleophilen ist.^[41] Alternative, orthogonale Schutzgruppen für die Fmoc-Strategie sind die entsprechenden Ester: *tert*-Butyl, Allyl und Benzyl. Nicht nur die verwendeten Schutzgruppen, sondern auch die Aktivierungsmethode, die Reaktionsbedingungen (Temperatur, pH-Wert, Reaktionszeit) und die Wahl des Lösungsmittels haben einen entscheidenden Einfluss auf die stereoselektive Synthese von Glykopeptidbausteinen. Ein generelles Schema für den Ablauf einer Glykosylierungsreaktion ist nachfolgend abgebildet (Schema 2).^[53]

Einleitung



Schema 2. Allgemeiner Verlauf einer Glykosylierungsreaktion unter Nachbargruppen-Einfluss. Zu Beginn erfolgt die Aktivierung des Glykosyl-Donors mittels eines Promotors (z.B. Lewis-Säure), worin die Bildung eines Donor-Promotor-Komplexes resultiert. Nach Dissoziation der Abgangsgruppe wird aus dem entstandenen Carbokation sowohl ein Acyloxonium-Ion mit der Nachbargruppe als Hauptprodukt gebildet, als auch ein Oxocarbenium-Ion. Beide ermöglichen je zwei Angriffspunkte für einen nukleophilen Angriff des entsprechenden Glykosyl-Akzeptors (a-d). Aus dem Oxocarbenium-Ion kann über einen Unterseiten-Angriff das 1,2-*cis* Glykosid gebildet werden, welcher jedoch durch sterische Abschirmung der Nachbargruppe gehemmt ist (a). Ein Oberseiten-Angriff führt zum entsprechenden 1,2-*trans* Glykosid (b). Erfolgt der nukleophile Angriff am anomeren Zentrum des Acyloxonium-Ions, so wird ebenfalls das 1,2-*trans* Glykosid gebildet (c). Bei Angriff am Acyl-Kohlenstoff kommt es zur Bildung eines Orthoesters (d).

Der stereoselektive Erhalt von β -Glykosiden resultiert aus dem Nachbargruppeneffekt, den ein entsprechender Ester der jeweiligen Schutzgruppe in Position 2 ausübt. Über die Carbonylgruppe des Esters wird mit dem anomeren Zentrum eine Oxonium-Zwischenstufe ausgebildet, die durch die Unterseitenabschirmung bevorzugt Oberseiten-Angriffe des Glykosyl-Akzeptors begünstigt. Dabei weist die Acetyl-Schutzgruppe, vor Benzoyl und Pivaloyl, die stärkste Tendenz zur Oxonium-Ion Bildung auf.^[54] Weiteren Einfluss auf die Stereoselektivität der Reaktion üben, wie bereits erwähnt, die verwendeten Promotoren, Abgangsgruppen am Glykosyl-Donor und Lösungsmittel.^[51,53]

1.2.3 Glykosylierungsreaktionen

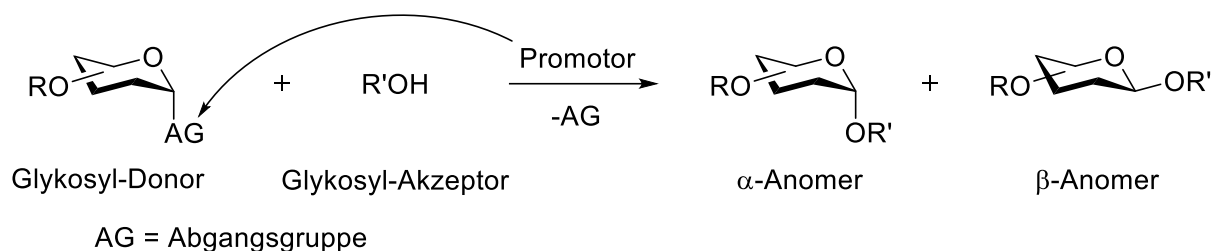
Bereits 1982 kommentierte PAULSEN: *“Although we have now learned to synthesize oligosaccharides, it should be emphasized that each oligosaccharide synthesis remains an independent problem, whose resolution requires considerable systematic research and a good deal of know-how. There are no universal reaction conditions for oligosaccharide synthesis.”*^[55] Speziell sein letzter Satz trifft sehr gut auf die Problematik zu, die hinter der chemischen Knüpfung glykosidischer Bindungen steht. Dies spiegelt sich bereits darin wieder, dass es eine Vielzahl möglicher Glykosylierungsreaktionen gibt, um eine stereoselektive Unterscheidung zwischen α - und β -Anomeren des Glykosyl-Donors, das Ausbleiben einer Racemisierung des Glykosyl-Akzeptors (entsprechende Aminosäure) und den Erhalt von Schutzgruppen während der Synthese zu gewährleisten.^[52] Nachfolgend ist eine tabellarische Auflistung möglicher Glykosyl-Donoren und Promotoren und den entsprechenden Namensreaktionen bzw. Besonderheiten.^[56]

Tabelle 1. Auflistung diverser Namensreaktionen zur Glykosylierung unter Verwendung spezieller Abgangsgruppen am anomeren Zentrum und den entsprechenden Promotoren.

| Abgangsgruppe des Glykosyldonors | Promotor | Besonderheit |
|---|---|--|
| OH | H^+ , $BF_3 \times Et_2O$, $FeCl_3$ | FISCHER-Methode, liefert α -Anomer ^[57] |
| OAc | $BF_3 \times Et_2O$, $SnCl_4$, $TMSOTf$, $ZnCl_2$ | HELFERICH-Methode, Schützung des C-Terminus der Aminosäure nicht nötig ^[58] |
| Br, Cl | $AgCO_3$, $AgOTf$, $Hg(CN)_2$ | KOENIGS-KNORR Methode, Glykosylierung unter Stereo-inversion, vollständig geschützte Aminosäure benötigt ^[59] |
| Trichloracetimidat OC(NH)CCl₃ | $BF_3 \times Et_2O$, $TMSOTf$, I_2 , $AgOTf$, $TfOH$ | SCHMIDT-Methode, milde Reaktionsbedingungen aber labile Donoren ^[60,61] |
| SAryl | $MeOTf$, $NIS/TfOH$, I_2 | Lange lagerbar, hohe Stabilität ^[62-65] |

1.2.3.1 O-Glykosylierung

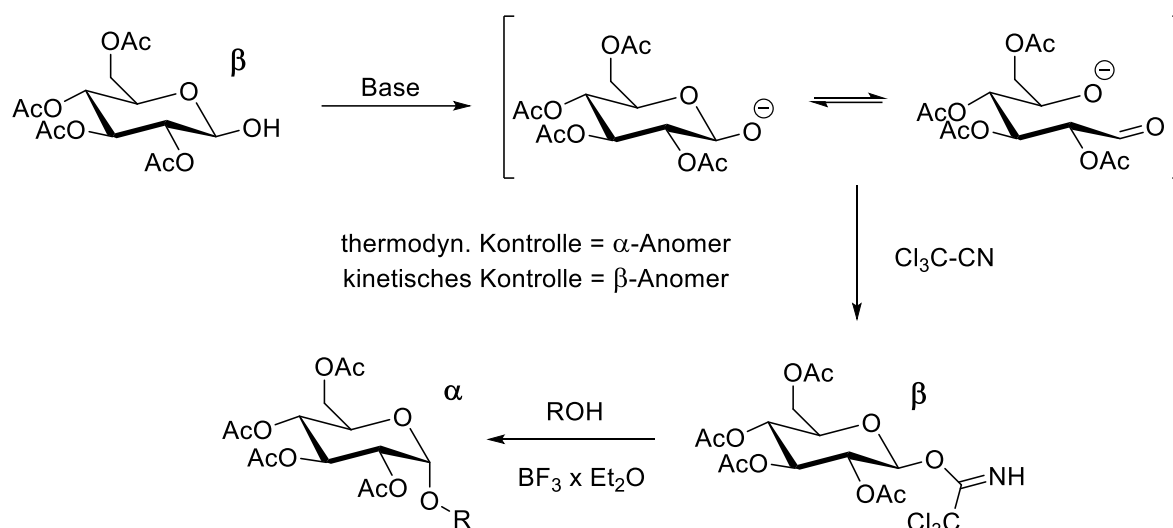
Der generelle Verlauf einer O-Glykosylierungsreaktion beginnt mit der Aktivierung der Abgangsgruppe an dem anomeren Zentrum des Glykosyl-Donors mittels eines Promotors (z.B. Lewis-Säure). Anschließend erfolgt der nukleophile Angriff des Glykosyl-Akzeptors, wodurch unter Abspaltung der Abgangsgruppe sowohl das α - als auch das β -Anomer als Produkt gebildet werden (Schema 3).



Schema 3. Genereller Verlauf einer Glykosylierungsreaktion ohne Stereokontrolle mit Bildung beider Anomere.

Die erste Glykosylierungsmethode wurde bereits 1879 von A. MICHAEL als nukleophile Substitution der anomeren Abgangsgruppe (Chlorid) gegen einen, als Salz vorliegenden, Glykosyl-Akzeptor (K^+OR^-), beschrieben.^[66] 1893 folgte E. FISCHER, der die Trimethylsilylchlorid vermittelte Glykosylierungsreaktion von Glukose mit Methanol unter Bildung des Methylglykosids durchführte. Für seine Methode wurden die entsprechenden Glykosyl-Akzeptoren stets als Lösungsmittel eingesetzt und lieferten bei Verwendung von Glukose das α -Anomer.^[57] Wenige Jahre später beschrieben W. KOENIGS und E. KNORR eine Methode, bei der Glykosylhalogenide (überwiegend Bromide) als Donoren eingesetzt wurden und unter Silbersalz-Zugabe mit Alkoholen stereospezifisch die entsprechenden 1,2-*trans*-Glykoside lieferten.^[59] Die stereokontrollierte $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion wurde dabei durch niedrige Temperaturen und die Verwendung von unpolaren Lösungsmitteln begünstigt. Nach einem ähnlichen Prinzip verläuft die B. HELFERICH-Methode, deren Stereoselektivität über den Nachbargruppeneffekt der Acetyl-Schutzgruppe gesteuert wird, was bereits in Schema 2 erläutert wurde.^[58,67] Eine weitere beliebte Glykosylierungsreaktion ist die in 1980 von R. R. SCHMIDT beschriebene Trichloracetimidat-Methode, die unter Lewis-Säure-Katalyse eine Überführung der β -Glykosylimidate in das entsprechende α -Glykosid ermöglicht (Schema 4).^[60] Der Vorteil dieser Glykosylierungsreaktion gegenüber den anderen ist ein geringer Verbrauch an Promotor, ein Verzicht auf Schwermetallsalze und die einfache Herstellung diverser Trichloracetimide.

Einleitung



Schema 4. Trichloracetimidat-Methode nach R. R. SCHMIDT. Die Deprotonierung des β -Glykosids liefert die beiden Übergangszustände. Die Umsetzung zum Trichloracetimidat führt über thermodynamische Kontrolle (Base: NaH, CsCO₃, KOH + Phasentransferkatalysator)^[68,69] zum α - bzw. über kinetische Kontrolle (Base: K₂CO₃)^[70] zum β - Trichloracetimidat. Anschließend erfolgt die Lewis-Säure katalysierte Glykosylierung mit einem entsprechenden Alkohol.

Weitere Ansätze bauen auf der Verwendung von Epoxiden,^[71] Thioglykosiden, Sulfoxiden^[72] und Glykalen^[73] als Glykosyl-Donoren auf - für diese Methoden sei auf die angegebene Literatur verwiesen. Generell sind die Anforderungen an eine effiziente Glykosylierungsreaktion auf drei Punkte einzugrenzen:^[74]

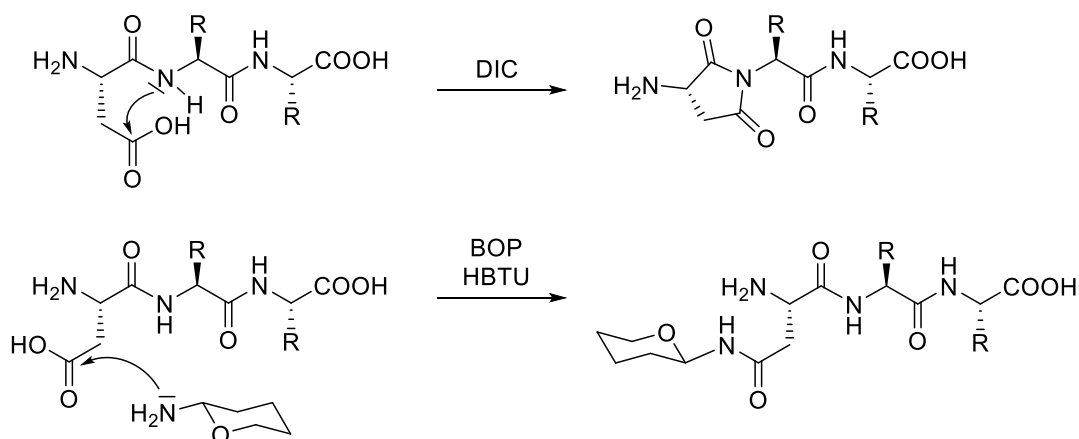
- Atomeffizienz: niedriger Verbrauch an Promotor zur Aktivierung des Donors
- Stereoselektivität: hohe Ausbeute des gewünschten Produkts
- *Upscaling*: Glykosylierungsprodukte in größeren Mengen produzierbar

Wie schwierig es ist, diese Anforderungen gleichzeitig zu erfüllen, zeigt sich allein daran, dass bereits so viele verschiedene Glykosylierungsmethoden entwickelt wurden. Darüber hinaus üben sehr viele Faktoren einen Einfluss auf die Stereoselektivität aus - Parameter wie Konzentration des Donors/Akzeptors, Abgangsgruppe am anomeren Zentrum, Temperatur, Druck, Lösungsmittel, Reihenfolge der Zugabe, Menge und Art der Lewis-Säure sind entscheidende Mittel zur Steuerung.^[74] Mit einer Übertragbarkeit der Reaktionsbedingungen zwischen verschiedenen Zuckern ist daher nicht zu rechnen. Somit ist und bleibt der Weg über eine enzymatisch-gesteuerte Einführung von Sacchariden in Peptide der beste und vor allem effektivste Weg, der jedoch außerhalb des lebenden Organismus nicht nachempfunden werden kann, da die entsprechenden Wirkmechanismen nicht vollständig aufgeklärt sind.^[74]

Die häufigste Form der *O*-Glykosylierung ist die sogenannte mucinartige Glykosylierung. Bei dieser wird *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) mit der β -Hydroxygruppe eines Serin- oder Threonin-Rests über eine α -*O*-glykosidische Bindung verknüpft.^[75] Mucinartige Glykosylierungen kommen häufig in Zelloberflächen Proteinen vor, ermöglichen dort Wechselwirkungen der Zelle mit der Umgebung und sind für die immunologischen Abwehrreaktionen verantwortlich.^[76]

1.2.3.2 *N*-Glykosylierung

Für den Aufbau von *N*-Glykosiden ist eine etwas andere Vorgehensweise von Nöten, da der Glykosyl-Donor eine Amin-Funktion am anomeren Zentrum trägt und ein Aktivester der Asparaginsäure generiert werden muss, sodass eine Kupplungsreaktion zur gewünschten Amidbindung führen kann. Gängige Kupplungsreagenzien für die Amidbildung sind *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Benzotriazol-1-yl-oxy-*tris*-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) und *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU).^[77,78] Diisopropylcarbodiimid (DIC) zeigte sich zur Bildung des Aktivesters der Asparaginsäure als ungeeignet. Es wurde eine intramolekulare Succinimid-Bildung als Nebenreaktion beobachtet, wobei eine signifikante Menge an Aspartimid gebildet wurde, wenn zusätzlich eine zu große Menge an Base (Diisopropylamin DIPEA) vorhanden war (Schema 5).^[37]



Schema 5. Die Aktivierung der Asparaginsäure mit zwei verschiedenen Kupplungsreagenzien liefert zwei unterschiedliche Produkte. DIC führt zu Nebenreaktionen mit Aspartimidat Bildung (oben). Die Verwendung von BOP mit HBTU unter Zugabe eines *N*-Glykosyl-Donors ergibt die gewünschte Kupplung zum *N*-Glykosid (unten).

Geschützte Glykosylamine können über Reduktion der entsprechenden Glykosylazide unter milden Bedingungen hergestellt werden.^[79,80] Eine alternative Synthesemethode geht von der Umsetzung von Asparaginsäure mit den entsprechenden Isothiocyanaten oder Pentenyl Glykosid-Donoren aus.^[34,81] Generell kommen auch chemoselektive Ligationsmethoden wie die native chemische Ligation für den Aufbau größerer, *N*-glykosylierter Peptide zum Einsatz, oder es kann auf die chemoenzymatische Synthese von *N*-verknüpften Glykopeptiden zurückgegriffen werden, die als die meist verbreitetste Methode gilt.^[82-84] Im Organismus kommt die *N*-Glykosylierung dagegen nur an Asparagin-Resten vor und findet posttranslational im ER an der Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr (X = beliebige AS außer Pro/Ser/Thr) statt.

1.2.3.3 S-Glykosylierung

Obwohl *S*-Glykoside in der Natur nur sehr selten vorkommen (Membran von Erythrocyten^[43] und Lincomycin),^[42] so haben sie dennoch einen sehr großen Nutzen in Bezug auf ihre Beständigkeit gegenüber enzymatischem Abbau (Abb. 9).^[85] Die glykosidische Bindung wird in diesem Fall über das Thiol des Cysteins mit dem anomeren Zentrum eines Saccharids, analog zu den *O*-Glykosiden, gebildet.^[34]

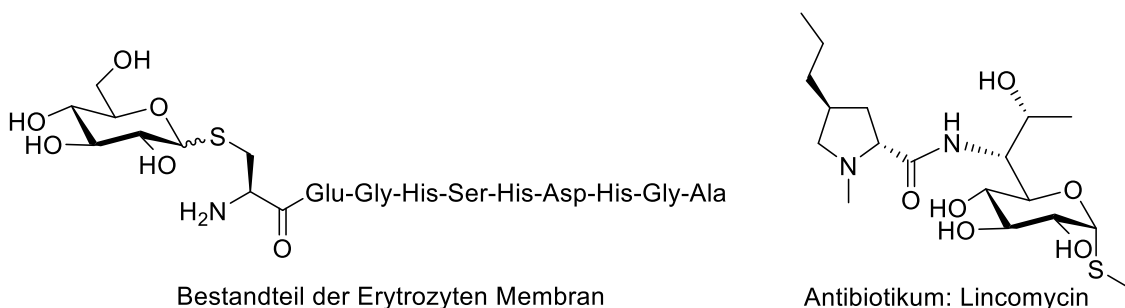


Abbildung 9. Aus der Natur bekannte *S*-Glykoside. Links ist ein Glykopeptid gezeigt, das Bestandteil der Erythrozyten Membran ist. Ein Glukose-Rest ist *S*-glykosidisch an Cystein gebunden. Lincomycin wird als Antibiotikum bei Infektionskrankheiten eingesetzt. Es setzt sich aus Propylprolin und Methylthiolincosaminid zusammen.^[42,43]

Neben der größeren Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau, gibt es einige weitere Vorteile der Thioglykoside gegenüber den *O*-Analoga. So ist bei Thioglykosiden zum einen die Stabilität gegen saure Hydrolyse und ihre Nukleophilie erhöht, dagegen jedoch die Basizität und die Anomerisierungs-Tendenz der 1-Thiopyranosen verringert.^[86] Zusätzlich dienen Thioglykoside, aufgrund der Fähigkeit des Schwefels als Nukleophil, Elektrophil und Radikal reagieren zu können, als vielseitige Donoren für die weitere Umsetzung mit Oligosacchariden.

Aus diesem Grund wird ihnen eine große Rolle in der Entwicklung neuer Oligosaccharid-mimetika zugesprochen.^[87,88]

1.2.4 Glykopeptid/-protein Erkennung

Die Erkennung von Glykopeptiden im Organismus bietet durch die stete Weiterentwicklung neuer Methoden ein wachsendes Potential auf dem Weg der Genom- und Proteom-Entschlüsselung. Neben der Bestimmung der genauen Glykosylierungsposition im Protein und spezieller Glykosylierungsmuster in spezifischen Bereichen des Proteoms, ist auch die Quantifizierung des prozentualen Anteils an glykosylierten Proteinen möglich.^[89] Für die spezifische Erkennung von glykosylierten Proteinen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (Abbildung 10).

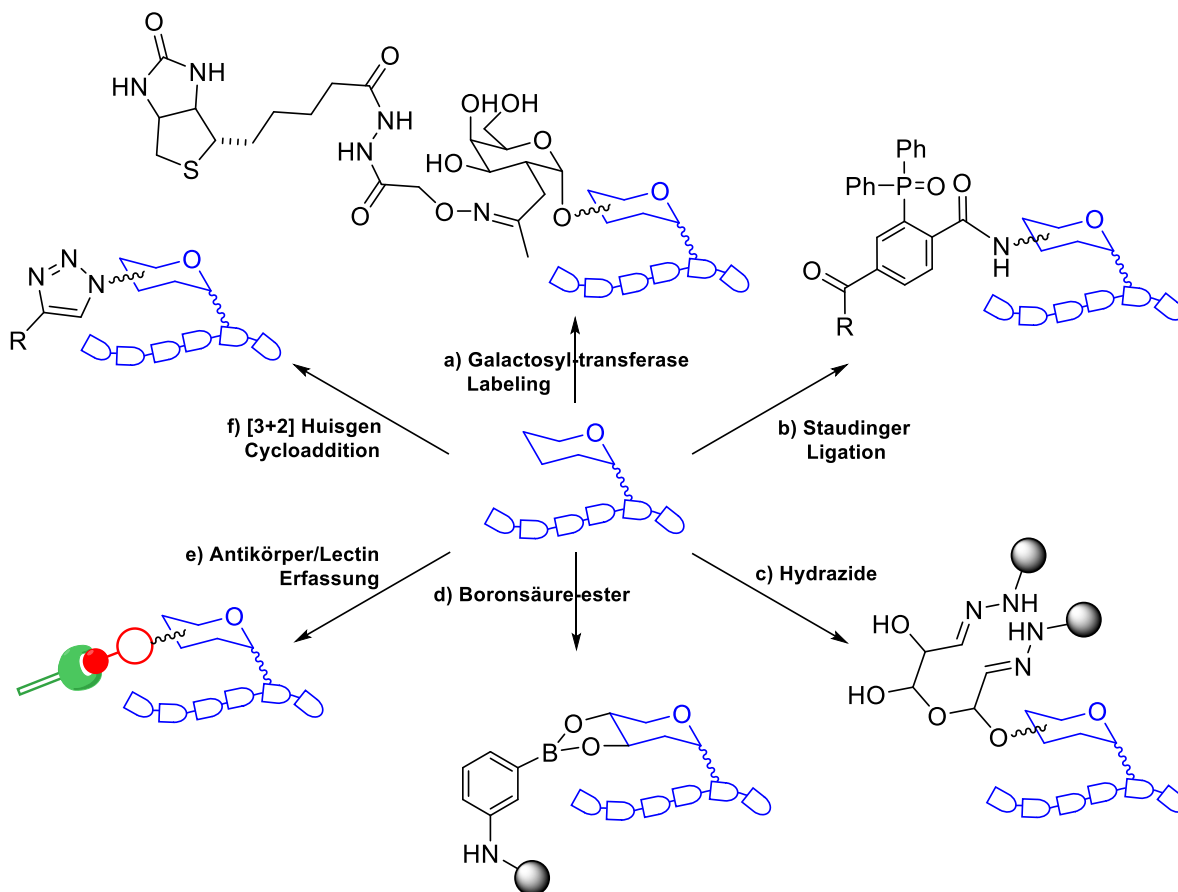
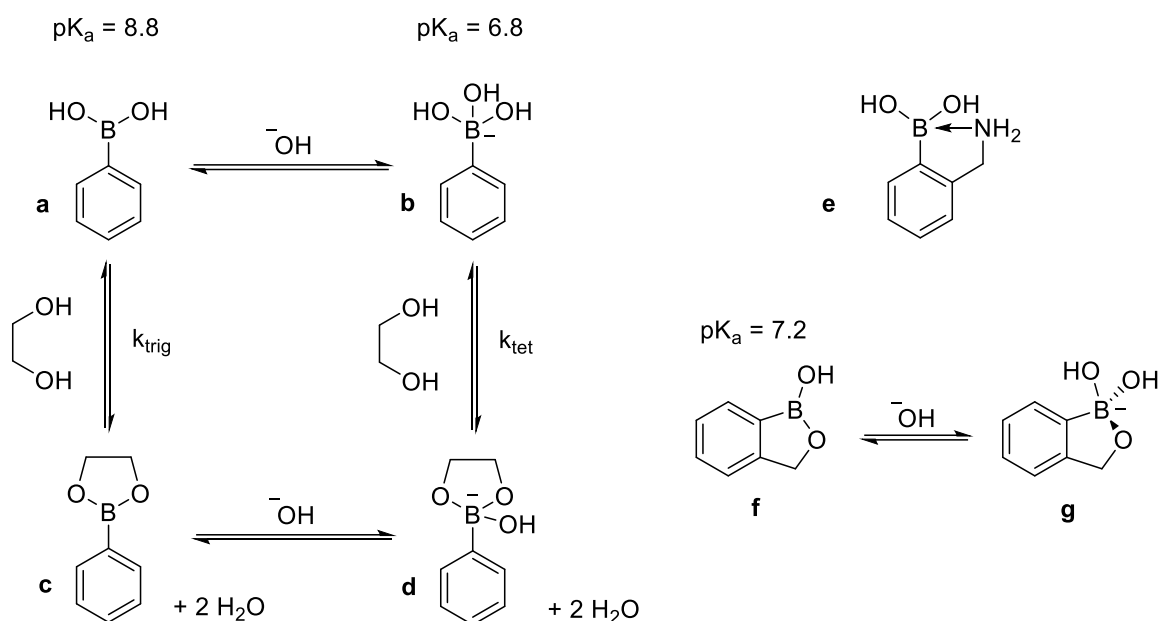


Abbildung 10. Methoden zur Isolierung für Glykoproteine aus Gewebe- oder Zelllysaten durch Nutzung der Eigenschaften von Zuckermodifikationen an Proteinen. a) Enzyme können Ketozucker einbringen, die wiederum als *labeling-target* dienen.^[90] Mittels Staudinger Ligation^[91,92] (b) bzw. [3+2] Huisgen Cycloaddition^[93,94] (f) können diese detektiert werden. c) & d) Isolation auf Basis von unterschiedlichen Reaktivitäten: Aldehyde werden mit immobilisierten Hydraziden zur Reaktion gebracht^[95-97] (c) bzw. geminale Dirole können mit Boronsäuren verestert werden (hier auf festem Träger)^[98,99] (d). e) Mit Hilfe von Antikörpern bzw. Lectinen können Glykoproteine spezifisch erkannt und isoliert werden.^[100,101]

Um die genannten Methoden anwenden zu können, bedarf es jedoch zuerst einer Auftrennung des Zelllysats in die glykosylierten und unglykosylierten Bestandteile. Dies kann entweder durch physikalische Methoden, in Form von Affinitäts-Aufreinigung mit Lectinen oder Antikörpern für spezifische Zuckermodifikationen, oder durch spektrometrische Methoden erreicht werden.^[102] Auch die chemische Markierung mit Labels, die über typische Reaktionen von Glykoproteinen eingeführt werden können, ist eine gängige Methode, um ihre Isolation von unglykosylierten Bestandteilen zu ermöglichen. Generell erfolgt sehr häufig eine Label-Anbringung, über die z.B. eine Isotopen- oder eine Farbstoff-Markierung erzeugt wird, die wiederum eine massenspektrometrische Detektion gestattet.^[95,100,103] SPARBIER *et al.* machten sich in ihrem Ansatz die Eigenschaften von Boronsäuren zu Nutze, dass geminale Diolen zu den entsprechenden Boronsäureestern gebunden werden. Durch Anbindung von Boronsäuren an magnetische Kügelchen konnten Glykoproteine isoliert und anschließend mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert werden.^[98,99]

1.3 Eigenschaften von Boronsäuren und die damit verbundene Vielseitigkeit

Die strukturellen Ähnlichkeiten gepaart mit der unterschiedlichen Reaktivität des Bors im Vergleich zu Kohlenstoff verleihen dem Bor einen hohen Stellenwert in der organischen und medizinischen Chemie.^[104] In Form von Boronsäuren, die sich aus einem trivalenten Boratom mit zwei Hydroxy-Gruppen und einem Aryl- bzw. Alkyl-Rest zusammensetzen, haben sie die Eigenschaft einer Lewis-Säure, was mit einem freien *p*-Orbital zu erklären ist. Darüber hinaus kommt es in Gegenwart von Lewis-Basen zum einfachen Austausch zwischen dem neutralen, trigonal planaren sp^2 und dem anionischen, tetraedrischen sp^3 hybridisierten Bor (Schema 6). Je nach pK_a der entsprechenden Boronsäure (zwischen $pK_a = 4.5 - 10$),^[105,106] der sich über zusätzliche Substituenten am Aryl- bzw. Alkyl-Rest steuern lässt, findet diese Gleichgewichtsreaktion bereits im wässrigen Milieu statt.^[107] Diese Eigenschaft hat Boronsäuren für die Entwicklung neuer Inhibitoren für hydrolytische Enzyme attraktiv gemacht und wurde bereits 1971 für Serin-Protease-Inhibitoren genutzt.^[108,109] Eine weitere, sehr interessante Eigenschaft von Boronsäuren ist deren Fähigkeit zu einer reversibel kovalenten Komplexbildung mit 1,2- und 1,3-Diolen unter Bildung von zyklischen Boronsäureestern. Die ersten Untersuchungen aus diesem Bereich wurden bereits 1959 von LORAND und EDWARDS unternommen, indem sie die Affinitäten verschiedener Zucker zu Boronsäuren anhand der pH-Wert Änderung der Lösung gemessen haben.^[17]



Schema 6. Gleichgewichtsreaktion der Boronsäureveresterung (links). Die Boronsäure **a** und der entsprechende Ester **c** liegen in einer trigonal planaren Geometrie vor, durch Reaktion mit einer Lewis-Base wird die tetragonale Geometrie (**b** und **d**) ausgebildet. Boronsäuren reagieren mit Diolen zu stabilen zyklischen Estern, deren Bildung bei $pH > pK_a$ bevorzugt wird. Bei physiologischem pH-Wert gilt: $k_{tet} > k_{trig}$. Bei sogenannten WULFF-Typ Boronsäuren (**e**) schafft eine intramolekulare B-N dative Bindung zusätzliche Stabilität. Boroxole **f** zeichnen sich durch einen intramolekularen, fünf-gliedrigen Ring aus.

Dass aus der Veresterung zwischen Boronsäuren und Diolen eine stabile, kovalente B-O-Bindung hervorgeht, die zusätzlich unter bestimmten Bedingungen (pH-Wert abhängig) und externen Einflüssen wieder gespalten werden kann, macht das System zu einer attraktiven Basis für den Einsatz in der supramolekularen Chemie.^[110]

1.3.1. Anwendungsgebiete für Boronsäuren

Wie bereits erwähnt, finden Boronsäuren Anwendung in vielerlei Forschungsgebieten (Abb. 11). Sie sind ein wichtiger Bestandteil bei der Suzuki-Kreuzkupplung,^[111] bei Diels-Alder Reaktionen,^[112] bei der asymmetrischen Aminosäure Synthese,^[113] bei der Carbonsäure Aktivierung,^[114,115] als Schutzgruppe für Diole,^[116] bei der selektiven Reduktion von Aldehyden^[117] und als Templat in der organischen Chemie.^[118] Darüber hinaus dienen Boronsäuren als synthetische Rezeptoren für die Erkennung kleiner Zuckermoleküle wie Glucose^[119-126] oder finden Einsatz als Baumaterial für Micro- und Nanopartikel zu Analysezwecken.^[127-131] In Form von Polymeren werden sie für die kontrollierte Insulin-Freisetzung^[132] oder als Label

bzw. Manipulator für Proteine verwendet.^[133] Weiterhin finden Boronsäuren Verwendung als Enzym Inhibitoren,^[134] als Antikörper-Abbild für Zell-Oberflächen Polysaccharide,^[135,136] als Mittel für Borneutronen-Einfang-Therapie (BNCT)^[137] und in Polymeren zur regulierten Medikamentabgabe.^[138,104,139]

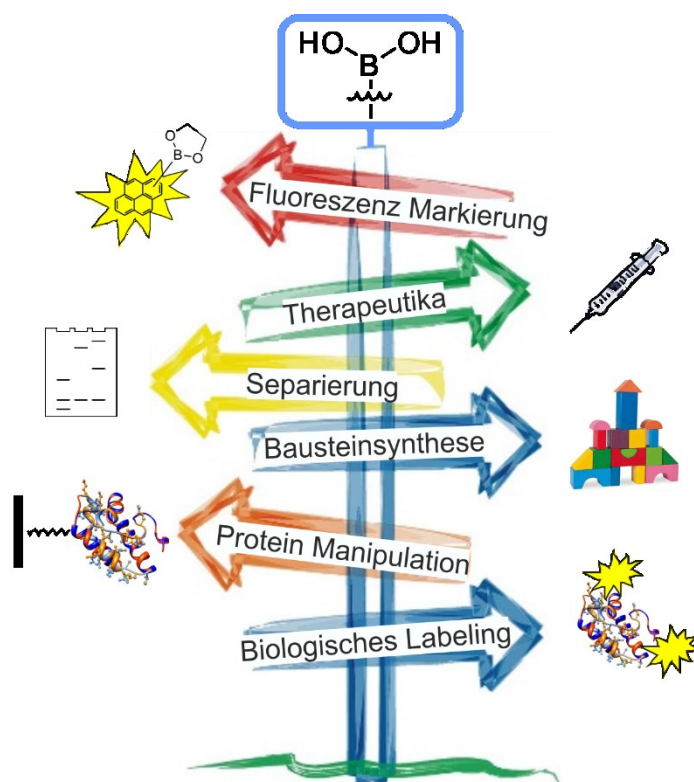


Abbildung 11. Darstellung verschiedener Anwendungsgebiete für Boronsäuren im Bereich der biologischen und medizinischen Chemie. Die bekanntesten Anwendungen beruhen auf der Fluoreszenz Markierung (z.B. durch Pyren-Reste), der Protein Manipulation und dem biologischen Labeling, dem Einsatz als Medikament oder zur Bausteinsynthese (z.B. Suzuki-Reaktion).

1.3.1.1 Boronsäuren als reversibel kovalent-bindende Zucker-Sensoren

Am häufigsten werden Boronsäuren jedoch als Sensoren zur Erkennung von Zuckern und Diolen wie Dopamin und Catecholaminen eingesetzt, da sie über diverse funktionelle Gruppen verfügen, die Fluoreszenz oder elektrochemisch aktive Reste vermitteln bzw. übertragen können.^[128,140-144] Die Detektion erfolgt dabei entweder über die Messung einer Änderung der optischen Eigenschaften oder der Leitfähigkeit, die aus der Veresterung resultiert.^[110,145] Sensoren, die auf die Änderung der Absorption im Zuge der Zucker-Bindung aufbauen, wurden z.B. von Arbeitsgruppen um WANG, SINGARAM, YAM, TAO, APPLETON/GIBSON und JAMES entwickelt und eine Auswahl solcher Polymere ist in Abbildung 12 aufgezeigt.^[146-151] Diese basieren zum Großteil auf Polymer-Systemen wie Hydrogelen. Generell beruht die Änderung

der Absorption entweder auf sterischen Effekten, die durch die Zucker-Insertion verursacht wird, oder auf der Störung der Wasserstoffbrücken zwischen den Boronsäuren in den Zwischenräumen der Polymere.^[1,107,152-154]

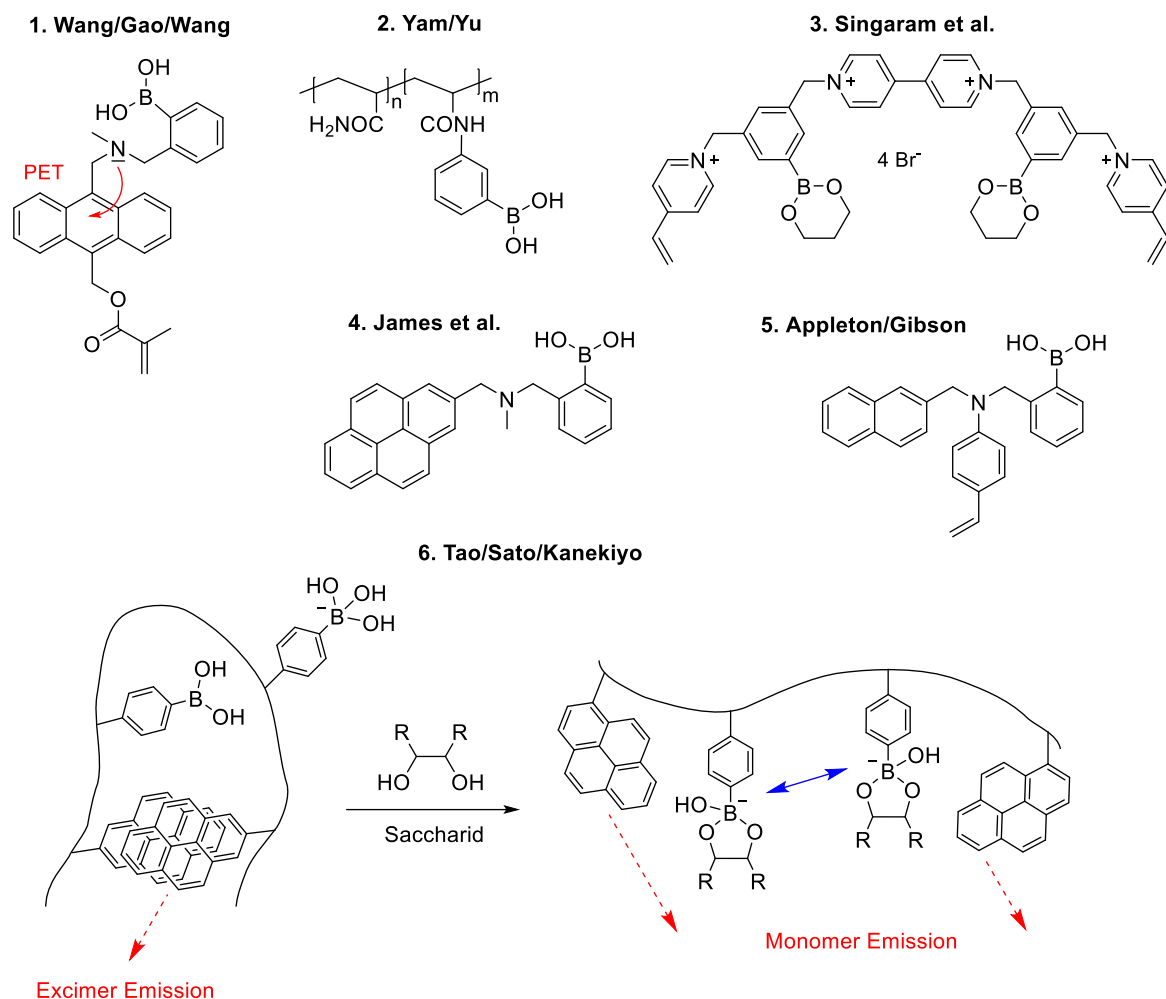


Abbildung 12. Übersicht diverser Sensor-Systeme basierend auf Boronsäuren. Die Arbeitsgruppe um WANG synthetisierten die ersten Boronsäure-basierenden Fluoreszenzpolymere durch templatvermittelte Polymerisation für die Zuckererkennung (gezeigt ist das Monomer in 1.). YAM und YU stellten aus den Monomeren Acrylamid und 3-Acrylamidophenylboronsäure über die freie radikalische Polymerisation das unter 2. abgebildete Polymer her. Aus der Arbeitsgruppe von SINGARAM et al. ging ein sogenannter kationischer, boronsäure-funktionalisierter „Quenscher“ (3.) hervor, der unter physiologischen Bedingungen als kontinuierlicher Glukose-Monitor dient und für Diabetis Patienten von Interesse sein dürfte.^[155] Der unter 4. gezeigte monomere Boronsäuresensor wurde als PET-Sensor in der Arbeitsgruppe um JAMES entwickelt, zeigte jedoch im Vergleich zu seinem dimeren Analogon eine verminderte Stabilität gegenüber D-Glukose. Boronsäure Vinyl-Derivate (5.) wurden von APPLETON und GIBSON hergestellt als Baustein für die Polymerisation mit Methacrylaten zu quervernetzten Polymeren. Diese Polymerpartikel mit unterschiedlichen Spacer-Längen wurden anschließend für die Saccharid-Titration eingesetzt und mittels Detektion der Fluoreszenz-Intensität klassifiziert. TAO, SATO und KANEKIYO synthetisierten ein fluoreszierendes, boronsäurehaltiges Copolymer, dessen Saccharid-Erkennung auf der konformationellen Änderung beruht, die durch einen Ladungswechsel hervorgerufen wird durch die Bindung eines Zuckers.

Die Saccharid-Sensoren, deren Detektion über die Änderung der Leitfähigkeit erfolgt, wurden von Arbeitsgruppen wie OKANO, MICHAELS und LEE entworfen. Dabei handelt es sich ebenfalls um Boronsäure-enthaltende Polymer-Systeme, die entweder auf Platin-Elektroden oberflächenbeschichtet,^[156] auf Hydrogele immobilisiert,^[157] oder mit Enzymen copolymerisiert wurden,^[158] um somit eine optische oder elektrochemische Detektion von Sacchariden zu ermöglichen.^[107] Weiterhin kann über den Boronsäurerest die Affinität gegenüber verschiedenen Sacchariden gesteuert oder zumindest beeinflusst werden. Ein beliebtes System, um die Affinität verschiedener Dirole gegenüber Boronsäuren zu bestimmen, beinhaltet die konkurrierende Boronsäureveresterung des entsprechenden Diols mit Alizarin Rot S (ARS). Die Fluoreszenz des gebundenen gegenüber eines ungebundenen ARS kann mittels UV-Vis-Spektroskopie detektiert werden und ermöglicht die Berechnung einer spezifischen Affinität.^[159-163] Auch lässt sich die NMR-Spektroskopie als nicht-invasive Technik für die *in vivo* Polyol Detektion nutzen. Dafür wird ein mit Boronsäure modifiziertes Bullvalen genutzt, welches durch die Veresterung mit einem Diol aus seiner zuvor isomerisierbaren Form in eine feste Konformation überführt wird (Abb. 12). Diese Konformationsänderung kann mittels ¹³C-NMR verfolgt und quantifiziert werden und ermöglicht die Untersuchung von Polyol-Mischungen anhand ihrer Affinität gegenüber eines bekannten Sensor-Moleküls.^[125]

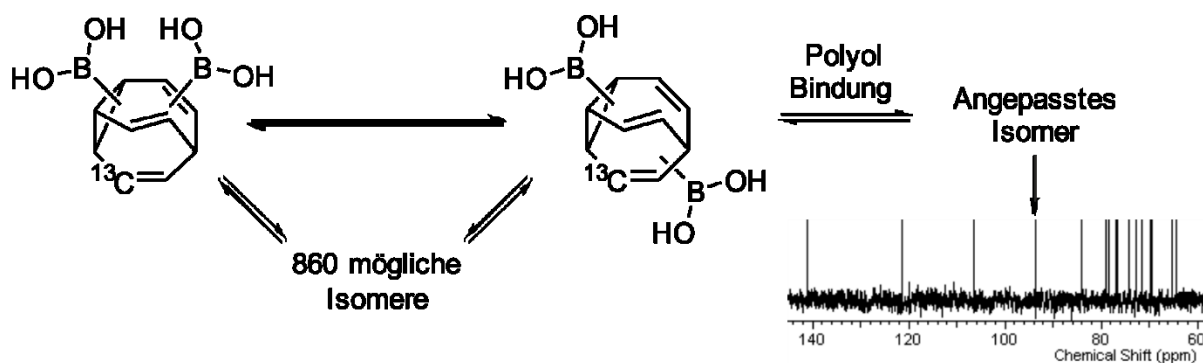
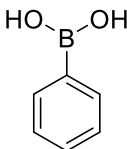
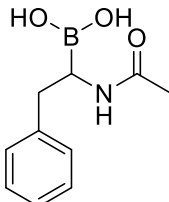


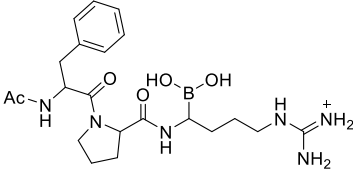
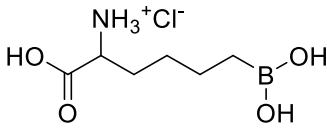
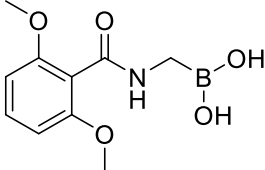
Abbildung 12. Strukturell flexibles Bullvalen Bisboronsäure System mit ¹³C-Markierung. Aus der dynamischen Bullvalen Population wird durch die Veresterung mit einem Diol ein entsprechend angepasstes Isomer geformt, welches mittels ¹³C-NMR identifiziert werden kann.

1.3.1.2 Enzyminhibitoren auf Basis von Boronsäuren

Boronsäuren sind in der Lage mit Aminosäuren wie Serin, Lysin und Histidin zu reagieren, indem ein Elektronenpaar vom Aminosäurerest auf das Boratom übertragen wird. Diese Reaktion ist auch für weitere Aminosäuren denkbar (Threonin, Tyrosin, Cystein, Hydroxyprolin), jedoch sind diese Wechselwirkungen nur mit den zuvor genannten Aminosäuren bekannt.^[133] Der zumeist hydrophobe Charakter von Bindungstaschen in Enzymen ermöglicht es den Boronsäuren mit besonders hoher Affinität und vor allem irreversibel zu inhibieren.^[133] Der erste bekannte Inhibitor auf Basis von Boronsäuren wurde 1971 von BENDER et al. beschrieben und diente als Protease Inhibitor.^[109] Dabei konnte mittels Röntgenkristallographie bestätigt werden, dass sowohl das Imidazol eines Histidins im aktiven Zentrum, als auch eine Serin-Seitenkette von der Boronsäure gebunden wurde. Auf Basis dessen lässt sich auch die Funktion von Boronsäuren als Serinprotease Inhibitoren erklären, da durch die Bindung der Boronsäure an die Hydroxy-Gruppe des Serins dieses nicht mehr als Nukleophil die Hydrolyse von Peptidbindungen einleiten kann. Im Folgenden sind einige Inhibitoren aufgeführt, die im Laufe der Jahre entwickelt und spezifiziert wurden.^[133,164]

Tabelle 2. Übersicht einiger Boronsäure-basierender Enzyminhibitoren und ihr Wirkmechanismus.

| Angriffsziel | Inhibitor | Mechanismus | Funktion |
|---|---|--|---|
| Serinproteasen generell ^[109] |  | Bindet Serin & Histidin im aktiven Zentrum | Inhibiert Peptidhydrolyse über Serinprotease (unspezifisch) |
| Chymotrypsin (Serinprotease) ^[165] |  | Ahmt Substrat nach (Übergangszustand Analogon) | Inhibiert Peptidsubstrat- abspaltung des Chymotrypsins |

| | | | |
|--|---|---|---|
| Thrombin (Trypsin-ähnliche Protease) ^[166,167] |  | Ahmt Substrat nach (Übergangs- zustand Analogon) | Hemmung der Blutgerinnung |
| Mn²⁺-Arginase ^[168] |  | Ahmt Substrat nach (Übergangszustand Analogon) | Regulierung der Substratverfügbar- keit für Stickstoff- monoxid Synthase |
| Serin-β- Lactamase ^[169] |  | Bindet Serin und Lysin im aktiven Zentrum | Inhibiert Antibiotika Resistenz |

Ein weiterer Proteasom Inhibitor, der bereits seit 2003 als Medikament gegen Multiples Myelom eingesetzt wird, ist Bortezomib (Velcade®).^[170] Dabei handelt es sich um ein Dipeptid, welches C-Terminal an eine α -Aminoboronsäure gebunden ist und somit statt der Carboxyl-Gruppe eine bioisostere Boronsäure trägt. Bortezomib inhibiert das Proteasom 26S, welches ein Hauptregulator des intrazellulären Proteinabbaus darstellt. In krebskranken Zellen kommt es zu einer beschleunigten und unkontrollierten Aktivität des Proteasoms 26S, weshalb eine Inhibierung dessen notwendig ist. Die Inhibierung erfolgt dabei über eine Komplexierung der Hydroxy-Gruppe des Threonins in der Chymotrypsin-ähnlichen Bindetasche des Proteasoms 26S und führt dazu, dass die Krebszellen sich nicht weiter vermehren können und Apoptose betreiben. Abbildung 13a zeigt Bortezomib im gebundenen Zustand im aktiven Zentrum des Proteasoms 26S.^[171,172]

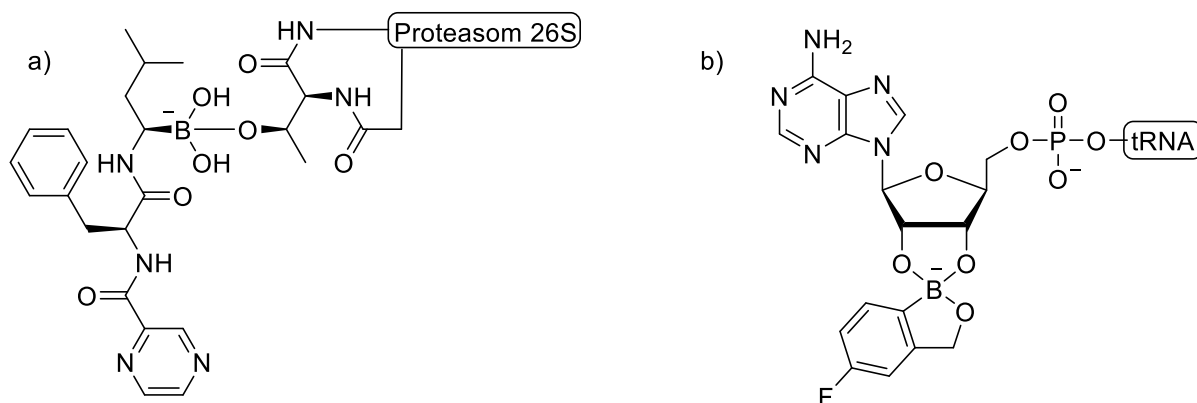


Abbildung 13. a) Der Proteaseinhibitor Bortezomib gebunden an die Hydroxy-Gruppe des Threonins im aktiven Zentrum des Proteasoms 26S. b) Inhibition der tRNA Synthetase durch ein fluoriertes Benzoboroxol Derivat AN2690. Die Komplexierung erfolgt über das *cis*-Diol der Ribose am 3'-Adenosin der tRNA und blockiert somit die Bindetasche des Enzyms, also die Proteinbiosynthese.

Das in Abbildung 13b gezeigte Benzoboroxol-Derivat AN2690 durchlief ebenfalls klinische Phasen als Medikament gegen Pilzinfektionen. Es greift die mykotische Leucyl tRNA Synthetase (LeuRS) an, welche für die Anbringung von Aminosäuren an die synthetisch aktive Tasche der tRNA verantwortlich ist bzw. falsch angebrachte Aminosäuren hydrolysiert und inhibiert letzteres in Anwesenheit von Adenosin-Nukleotiden.^[133,173,174]

Die geringe Toxizität von Boronsäuren und ihrer metabolisierten Abbauprodukte durch Deboronierung (Borsäure mit geringer Toxizität für den menschlichen Organismus) macht Boronsäuren weiterhin zu sehr interessanten Bausteinen auf dem Gebiet der medizinischen Chemie und der Medikamentenentwicklung.^[175] Sie sind extrem vielseitig in Bezug auf ihre Chemie, können eine Vielzahl an funktionellen Gruppen tolerieren und mit sich bringen und sind sowohl auf dem Gebiet der Sensorik, als auch als Inhibitoren und Rezeptoren vielversprechende Bausteine.^[175] Ihre Fähigkeit zur Selbstorganisation und -erkennung über reversibel kovalente Bindungsknüpfung gewährt Boronsäuren den Eintritt in die supramolekulare Chemie, sowie Relevanz auf dem Gebiet der dynamisch kovalenten Chemie (DCC).^[21,176-178] Die Boronsäureveresterung wurde sogar von YAN et al. als die wahrscheinlich stärkste reversible Wechselwirkung funktioneller Gruppen miteinander (ausgehend von organischen Reagenzien) deklariert, die unter physiologischen Bedingungen im wässrigen Milieu verwendbar sind.^[106,176]

1.4 Proteinkinase A

Proteinkinasen sind als die wichtigsten Signalüberträger in eukaryotischen Zellen bekannt. Ihre Funktion als Phosphorylierungs-Transmitter zu regulatorischen Zwecken in der Zelle wurde bereits Ende der 1950er Jahre von KREBS und FISCHER anhand einer Studie mit Glycogen Phosphorylase und der Entdeckung der entsprechenden Kinase festgestellt.^[179] Die cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) abhängige Proteinkinase (kurz: PKA) ist ein Enzym dieser Klasse, bestehend aus zwei regulatorischen (je 46 kDa) und zwei katalytischen Untereinheiten (je 41 kDa), das über Phosphorylierung andere Enzyme reguliert bzw. aktiviert (Abb. 14).^[180]

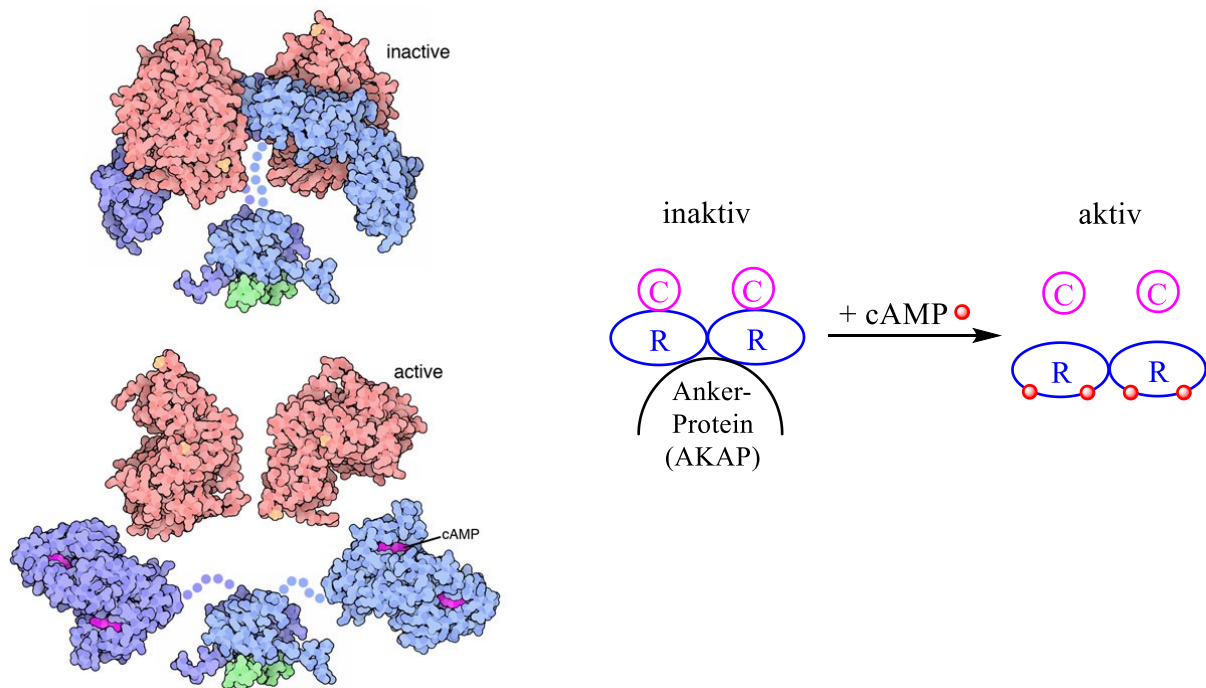


Abbildung 14. cAMP-abhängige Proteinkinase A in der inaktiven und der aktiven Form (links, PDB-Code: 3tnp).^[180] Bei niedrigen cAMP-Konzentrationen bindet ein Dimer der regulatorischen Untereinheit an die katalytischen Untereinheiten (blau), sodass ein inaktiver Komplex vorliegt. Die Aktivierung erfolgt durch Bindung von cAMP (bei steigenden Konzentrationen) an die regulatorischen Untereinheiten, wodurch die katalytischen Untereinheiten (rot) in ihrer aktiven Form freigesetzt werden. Der Vorgang ist im rechten Bild nochmals schematisch dargestellt und an die Farben der Kristallstruktur links angepasst.

PKA selbst wird durch den *second messenger* cAMP stimuliert und bildet in Abwesenheit von cAMP einen inaktiven Komplex, in welchem die Substratbindestelle der katalytischen Untereinheit von je einer Domäne der regulatorischen Untereinheit besetzt wird. Im Zuge der cAMP Aktivierung, die an vier Bindestellen der beiden regulatorischen Untereinheiten erfolgt, kommt es zu einer Konformationsänderung und der damit einhergehenden Dissoziation des

Komplexes in seine vier Untereinheiten. Durch die Freisetzung der beiden katalytischen Untereinheiten sind die Substratbindestellen für die Anbindung der zu regulierenden Enzyme zugänglich.^[181,182] Die Übertragung des terminalen Phosphat-Rests des ATPs von der katalytischen Untereinheit auf spezifische Serin- und Threonin-Reste der Enzyme ermöglicht die Regulierung ihrer Aktivität (Abb. 15).^[183,184]

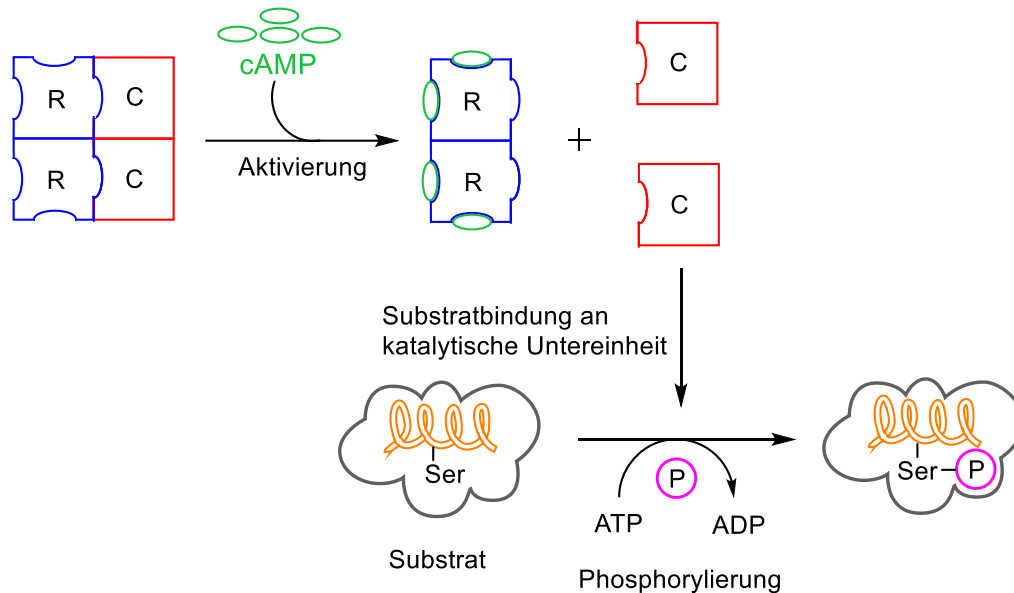


Abbildung 15. Der katalytische Zyklus der Proteinkinase A. Der quartäre Komplex aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten wird durch cAMP aktiviert und dissoziiert in den aktiven Komplex. Die Substratanbindung an die katalytische Untereinheit ermöglicht dessen Phosphorylierung mittels des Coenzym ATP. Die Spaltung des cAMPs durch Phosphodiesterase inaktiviert den Zyklus.

Einer regulatorischen Funktion kommt die PKA in vielen Bereichen des menschlichen Körpers nach. So steuert die PKA in Abhängigkeit der Konzentration des sekundären Botenstoffs cAMP grundlegende Prozesse des Zellzyklus, der Genregulation und des Stoffwechsels. Darunter fallen zum Beispiel Funktionen wie die Regulierung des Glykogen- und des Lipidabbaus im Zytosol, die Kontrolle von Ionenkanälen und die Aktivierung spezieller Transkriptionsfaktoren.^[185-187] Dabei gehört die PKA zu einer, aus insgesamt drei Vertretern bestehenden Gruppe der AGC Kinasen (Proteinkinase A, G und C), die mit insgesamt 63 von 518 bekannten humanen Kinasen, die größte Gruppe darstellt.^[188] Darüber hinaus wird die PKA als die am besten untersuchte Kinase gehandelt und aufgrund dessen häufig als Modellsystem verwendet, da bereits vor vielen Jahren eine vollständige Sequenzierung und Rekombination dieser Kinase möglich war.^[182,183,189,190] Über einen Zeitraum von vielen Jahren wurden der Wirkmechanismus, der Aufbau und die Regulierung von PKA immer weiter untersucht und entschlüsselt und konnte mit vielen Kristallstrukturen belegt werden. Da das gesamte Protein

am katalytischen Zyklus beteiligt ist, wurden alle Untereinheiten der PKA betrachtet und auch die Einflüsse vor und nach der Wirkkaskade untersucht.^[184,191-194] In Anbetracht der hohen Relevanz der Funktionen von PKA ist es nicht verwunderlich, dass die Kontrolle und Regulierung dieses Enzyms von enormer Bedeutung für den Organismus ist, und daher viele weitere Kinasen am Wirkmechanismus beteiligt sind. Dass die Phosphorylierung nur zu bestimmten Zeitpunkten und in definierten Mengen vollzogen wird, kann die Zelle durch den gezielten Zusammenbau spezieller regulatorischer Untereinheiten steuern. Dies geschieht unter Zuhilfenahme sogenannter A-Kinase-Ankerproteine (AKAP), welche für die räumliche Nähe zwischen PKA und ihren Substraten während der Signalkaskade sorgen.^[192,195] Auch die Möglichkeit der Unterbrechung einer cAMP-Aktivierung ist von enormer Bedeutung für die Zelle. Dafür kommen spezielle Phosphodiesterasen zum Einsatz, welche die unnatürliche zyklische Phosphatbindung im cAMP aufbrechen und somit inaktives AMP daraus formen.^[180,185] Die Übertragung eines Phosphatrestes ist nicht auf jedes beliebige Serin bzw. Threonin einer Substrat-Sequenz möglich. Sogenannte Konsensussequenzen, in diesem Fall bestehend aus Arg-Arg-Xaa-Ser-Xaa (mit Xaa = bevorzugt kleine, hydrophobe AS), müssen vorliegen, damit es zu einer Phosphorylierung des Substrats kommt.^[196,197] Darüber hinaus findet sich die Konsensussequenz auch in der regulatorischen Untereinheit wieder, wo sie eine inhibitorische Funktion ausübt. Durch Bindung dieser Inhibitor-Sequenz an die Substratbindestelle der katalytischen Untereinheit wird ebenfalls eine Unterbrechung des Wirkmechanismus erreicht, womit eine zusätzliche Stopp-Kontrollfunktion vorhanden ist.^[198] Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der katalytischen Untereinheit von PKA, weshalb im Folgenden näher auf diesen Teilbereich, sowie auf die bisher entwickelten Inhibitoren eingegangen wird.

1.4.1 Die katalytische Untereinheit der PKA

Die katalytische Untereinheit der PKA setzt sich aus einer großen und einer kleinen Domäne zusammen, die über eine Scharnierregion miteinander verbunden sind (Abb. 16). Zwischen beiden Domänen liegt die ATP Bindestelle, die sich nach der ATP- und Substrat-Bindung annähern, wodurch es auch zu einer Verschiebung der glycinreichen Schleife kommt, die die ATP-Bindestelle verschließt. Diese Abschirmung ermöglicht schließlich die Katalyse.^[184,191,192]

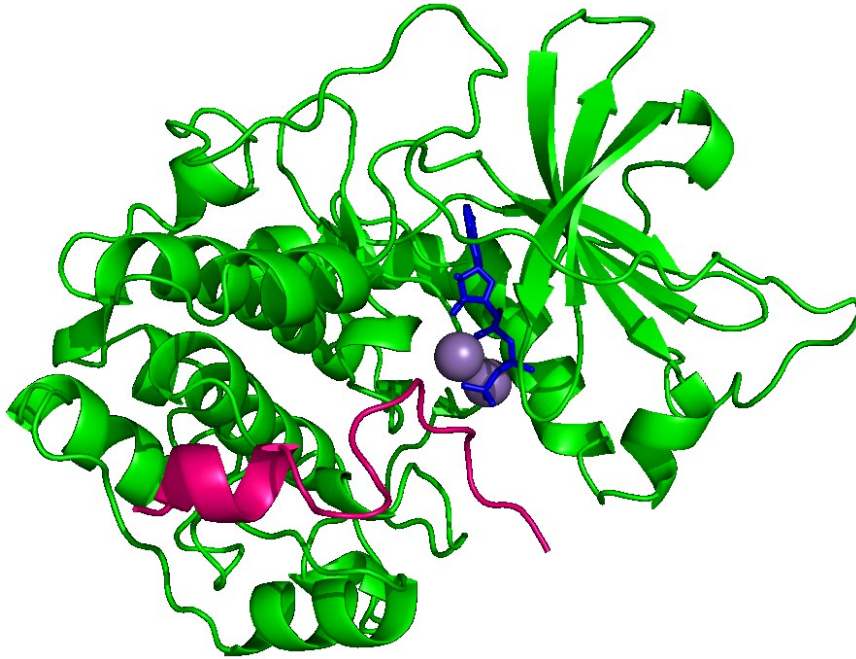


Abbildung 16. Kristallstruktur der katalytischen Untereinheit (grün, PDB-Code: 1ATP).^[199] Die Substratbindestelle ist mit einem Proteinkinase Inhibitor-Ausschnitt (PKI) besetzt (pink), was die PKA in einer halbgeschlossenen Position fixiert. Weiterhin ist ATP (blau) im Kristall enthalten, sowie zwei Mangan-Kationen (lila).

Für Kristallisationsexperimente wird zumeist ein Proteinkinase Inhibitor-Ausschnitt (PKI) zugesetzt, der eine Substrat-Bindestelle der katalytischen Untereinheit besetzt. Bei PKI handelt es sich um ein PKA-inhibierendes Protein, welches ebenfalls die Konsensussequenz (Arg-Arg-Gly-Ser-Ile) für die Phosphorylierung aufweist, jedoch statt des Serins ein Alanin trägt. Dadurch kann zwar keine Phosphat-Übertragung stattfinden, die Bindung an das PKA ist jedoch trotzdem möglich.^[199,200] Die Metall-Kationen im Kristall koordinieren die Phosphatreste des ATPs, kompensieren dessen Ladung und erhöhen die Affinität.^[201]

1.4.2 Inhibitoren für die PKA

Wie bereits erwähnt, ist die Protein Phosphorylierung von enormer Bedeutung für die Zelle, da ein Großteil der stattfindenden Prozesse darüber reguliert wird. So hat die unkontrollierte Phosphorylierung zur Konsequenz, dass durch Überexpressionen, Mutationen oder mangelnde zelluläre Inhibition, diverse Krankheiten hervorgerufen werden können.^[202,203] Als potentielle Angriffspunkte für Inhibitoren der PKA kommen mehrere Stellen der katalytischen und regulatorischen Untereinheit in Frage. Am häufigsten wird die ATP-Bindetasche der Kinase mit ATP-kompetitiven Inhibitoren adressiert. Auch ist es möglich, die Substraterkennungsstelle

zu inhibieren oder bereits die regulatorische Untereinheit für die Inhibition zu nutzen, indem die cAMP- oder die AKAP-Bindestelle blockiert wird.^[204-207] Generell handelt es sich jedoch bei PKA mehr um ein Modellsystem für Kinasen, da es wegen seiner vielfältigen Beteiligung an diversen physiologischen Prozessen in der Zelle als ein eher ungeeigneter Kandidat für eine gezielte Inhibition zählt. Wegen der weitreichenden Entschlüsselung dieser Kinase und wegen der grundsätzlichen Ähnlichkeit zueinander dient das PKA-Modell jedoch für die Erforschung der Rho-Kinase und anderer ähnlicher Systeme.^[208,209] Bei der Rho-Kinase (ROCK) handelt es sich ebenfalls um eine Serin/Threonin Kinase, die für die Regulierung der Zellwanderung, -adhäsion und -vermehrung, der Kontraktion glatter Muskelzellen und der Organisation des Aktin-Zytoskeletts verantwortlich ist.^[208,210,211] Ein Inhibitor, der sowohl für die Rho-Kinase als auch für die PKA getestet wurde, ist Fasudil® (auch HA-1077 bzw. AT877) und wurde als erster Proteinkinase-Inhibitor im Jahre 1995 als Medikament bei zerebralem Vasospasmus verabreicht.^[203,209,212-215] Weitere klinische Tests für den Einsatz bei anderen Erkrankungen sind im Gange. Die Affinität des Fasudils® für die Rho-Kinase übersteigt zwar die der PKA, jedoch werden weiterentwickelte Inhibitor-Systeme zunächst mit PKA auf ihren K_D -Wert getestet und kristallisiert, um die intermolekularen Wechselwirkungen, die für die Ligand-Bindung verantwortlich sind, besser nachvollziehen und gegebenenfalls den Kinaseinhibitor optimieren zu können.^[203,205] In Abbildung 17 ist ein Ausschnitt aus der Kristallstruktur der PKA mit der natürlichen Inhibitor-Sequenz (PKI) gezeigt, in der die Strukturen des ATPs (in grün) und des Fasudils® (in blau) übereinandergelegt sind.

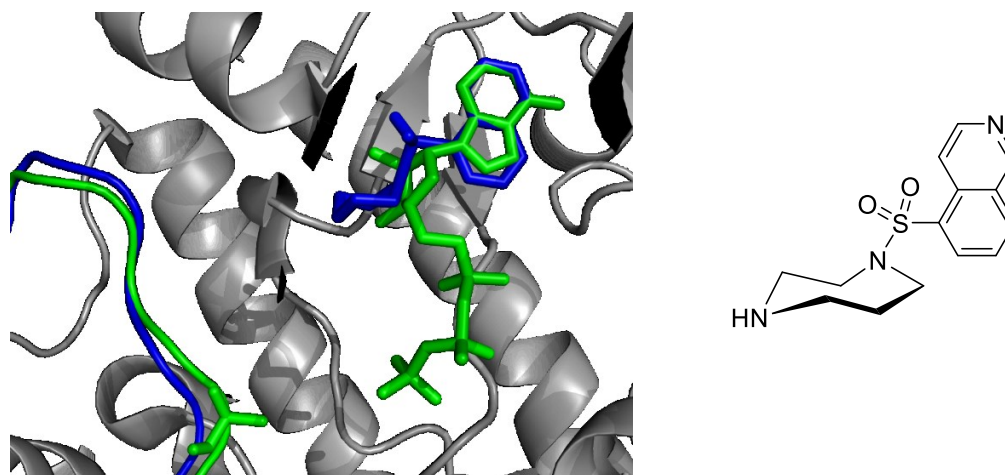


Abbildung 17. PKA im Komplex mit PKI und ATP (grün; PDB-Code: 1ATP)^[199] und PKA im Komplex mit PKI und dem Rho-Kinase Inhibitor Fasudil® (HA-1077 bzw. AT877) (blau; PDB-Code: 1Q8W).^[203] Das Isochinolinsulfon-amid Derivat ist rechts in der Strukturformel abgebildet.

In der Kristallstruktur ist deutlich zu erkennen, dass die aromatischen Systeme die gleiche Position einnehmen. Der Isochinolin-Ring des Fasudils® liegt an der Stelle des Adenins des ATPs und der Homopiperazin-Ring am Sulfonamid hat die gleiche Orientierung wie die Ribose im ATP.^[203] Fasudil® bildet diverse Wechselwirkungen mit PKA aus. Der Stickstoff des Isochinolinrings formt eine Wasserstoffbrücke mit dem Peptidrückrat-Amid des Val¹², das sekundäre Amin des heptameren Homopiperazinrings geht eine Wasserstoffbrücke mit dem Peptidrückrat-Carbonyl der Glu¹⁷⁰ ein (eigentlich zwischen Glu¹⁷⁰ und 3'OH des ATPs) und eine weitere Wasserstoffbrücke existiert zwischen dem Homopiperazin Stickstoff und der Seitenkette der Glu¹²⁷ (eigentlich zwischen Glu¹²⁷ und 2' und 3'OH des ATPs).^[209] Auch in dieser Arbeit hat die PKA die Funktion einer Modell-Kinase. Es wird sich für die Substrat-Sequenz- und Inhibitor-Modifikation zu Nutze gemacht, dass bereits diverse Kristallstrukturen existieren. Diese dienen zu Modeling-Zwecken, sodass die Synthesen zielgerichteter gestaltet werden können.

1.4.3 Bisubstrat-Inhibitoren für die PKA

Der reversible Ansatz zur Synthese von Bisubstrat-Inhibitoren wurde vor dieser Arbeit nicht beschrieben, sodass nun eine Übersicht einiger bisherigen Bisubstrat-Inhibitoren folgt. Das Konzept der Bisubstrat-Inhibitoren existiert seit den 1970er Jahren, welches auf der gleichzeitigen Adressierung von zwei verschiedenen Bindungstaschen eines Bisubstrat Enzyms basiert und Ähnlichkeiten zu zwei sehr effektiven Methoden für die Medikamenten Entwicklung aufweist: der Fragment-basierten Wirkstoffsynthese und dem Ansatz für Übergangszustand-analoge Inhibitor-Synthese.^[216-218] Dabei werden zwei konjugierte Fragmente bereitgestellt, welche z.B. über einen Linker miteinander verbunden sein können und die natürlichen Substrate/Inhibitoren der entsprechenden Kinase nachahmen. Zumeist erfolgt die Adressierung zum einen an der Phosphat-Donor-Bindestelle (ATP) und zum anderen an der Phosphat-Akzeptor-Bindestelle (Ser-, Thr-, Tyr-enthaltende Substrate).^[218,219] Die Entwicklung solcher Bisubstrat-Inhibitoren wurde von der Idee getrieben, dass durch das gleichzeitige Ansprechen zweier verschiedener Bindungsstellen, mehr Wechselwirkungen mit dem Zielenzym möglich sind. Resultierend aus den entropischen und enthalpischen Faktoren dieser Kombination wird sich ein synergistischer Effekt in Bezug auf die Affinität und Selektivität der Bisubstrate im Vergleich zu einzelnen Komponenten erhofft, was bisher in einigen Ansätzen diverser Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte.^[219-221] Der erste, auf Kinasen basierende Ansatz dieser Art gelang LIENHARD et al. im Jahre 1972. Sie entwickelten

eine Adenylat Kinase, P^1, P^5 -Di(adenosin-5')pentaphosphat, die als potenter Inhibitor fungierte (Abb. 18).^[222]

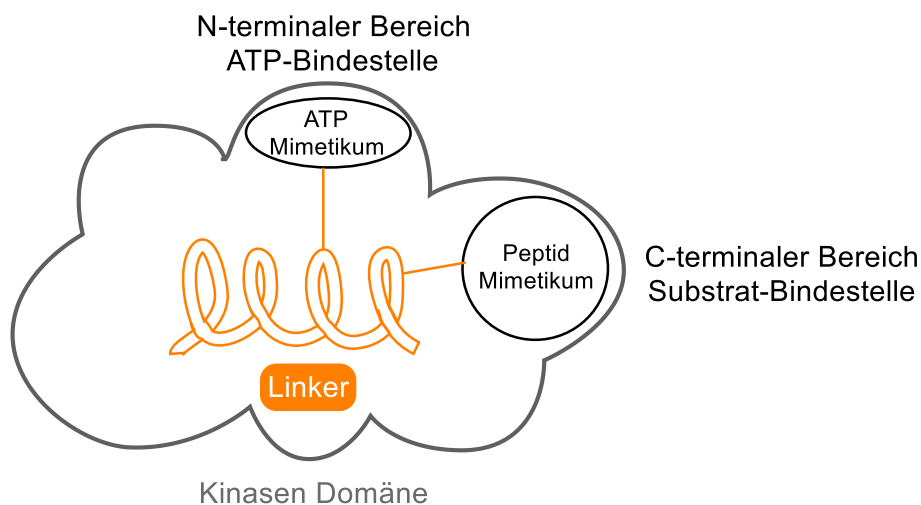


Abbildung 18. Schematische Darstellung des Prinzips der Bisubstrat analogen Inhibitor Verwendung. Innerhalb einer Kinase werden zeitgleich die ATP- und die Substrat-Bindestelle über einen Bisubstrat-Inhibitor adressiert. Dabei sind das ATP- und das Peptid-Mimetikum über einen Linker miteinander verbunden.

Die Anforderungen, die an ein Bisubstrat-Inhibitor gestellt werden, beinhalten zum einen die Fähigkeit, die Bindung beider natürlichen Substrate in ihrer Bindetasche zu unterdrücken und zum anderen ist eine Spezifität für nur eine bestimmte Proteinkinase erforderlich. Darüber hinaus muss bei der Synthese des Inhibitors darauf geachtet werden, dass die Geometrie und Orientierung des natürlichen Substrats eingehalten und auch die Wechselwirkungen mit dem Enzym um die Bindetasche herum aufrecht erhalten werden. Nicht zu vernachlässigen sind weitere Anforderung an Inhibitoren, wie beispielsweise hohe Bioverfügbarkeit sowie geringe Toxizität.^[219] Basierend auf diesen Anforderungen, wurden in den vergangenen 35 Jahren verschiedene Bisubstrat-Inhibitoren synthetisiert, von denen es einige bis hin zur klinischen Testung geschafft haben. Ein Überblick über vier verschiedene Ansätze für die Bisubstrat-Inhibitor Synthese ist in Abbildung 19 gezeigt. Darin enthalten sind zum Beispiel Sulfonamide und Sulfonylbenzoyl-Derivate, die von Arbeitsgruppen um KRUSE und RICOUART entwickelt wurden.^[223,224] Außerdem sind Beispiele von Carbonsäure Derivaten,^[225] Dipeptidyl und *N*-acetylierten Peptid Derivaten^[226,227] gezeigt, sowie ein von MEDZIHRADESKY *et al.* synthetisiertes Phosphodiester Derivat.^[219,228]

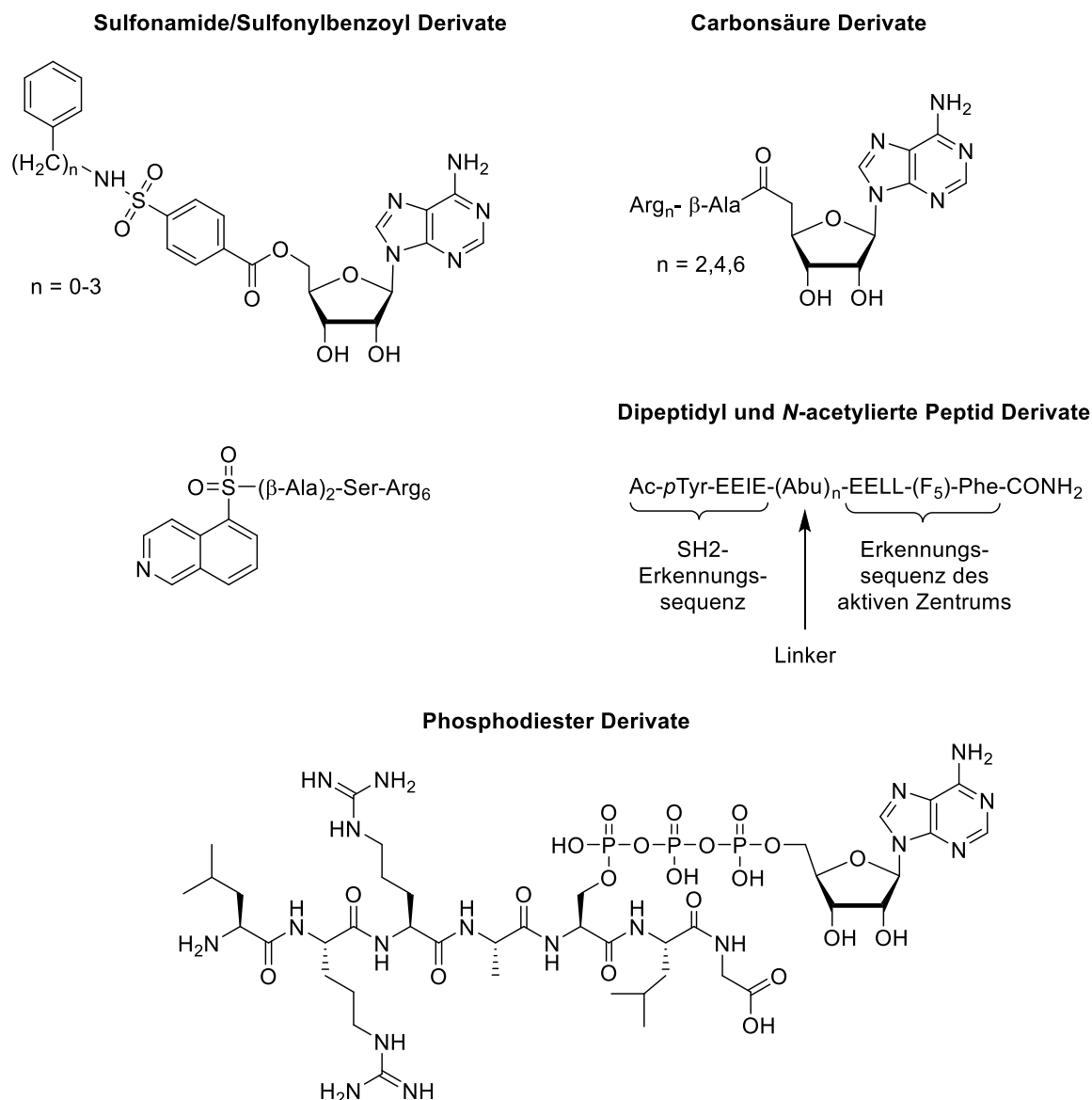


Abbildung 19. Beispiele für verschiedene Ansätze von Bisubstrat analogen Inhibitoren für Proteinkinasen. Darstellung vier verschiedener Kategorien: Sulfonamide bzw. Sulfonylbenzoyl-,^[223,224] Carbonsäure-,^[225] Dipeptidyl und N-acetylierte Peptid Derivate^[226,227] und Phosphodiester Derivate.^[219,228] Das Beispiel für Dipeptidyl und N-acetylierte Peptid Derivate enthält einen Aminobuttersäure Linker (Abu) und ein pentafluoriertes Phenylalanin ((F₅)-Phe).

Wird im Speziellen die Bisubstrat-Inhibitor Entwicklung für die PKA betrachtet, so ergibt sich als möglicher Ansatzpunkt eine kovalente Verknüpfung zwischen dem terminalen Phosphat des ATPs und der Hydroxy-Gruppe des Substrats.^[225,228-230] In den sogenannten Nukleotid-Peptid-Konjugaten wird dieses Prinzip aufgegriffen und liefert, entgegen der Erwartung der aufsummierten Affinität, größtenteils eher mäßige Ergebnisse mit niedrigeren Affinitäten.^[230] Die Verwendung von Adenosin-Derivaten, bei denen die Verknüpfung nicht mehr über den Phosphatrest erfolgt, sondern über einen anderen Linker (häufig Amino-hexansäure oder ähnliches) ein Substrat-nachahmendes Fragment gebunden wird, ergaben dagegen Affinitäten

im teils sub-nanomolaren Bereich.^[207] Solche Bisubstrat-Inhibitoren gehören zur Klasse der Adenosin analogen Oligoarginin-Konjugate (kurz: ARCs) und haben großes Potential durch weitere Derivatisierung eine Vielzahl an Kinasen spezifisch zu inhibieren.^[231,232] Ein Beispiel für eine erhaltene Kristallstruktur eines ARCs mit PKA ist in Abbildung 20 gezeigt.

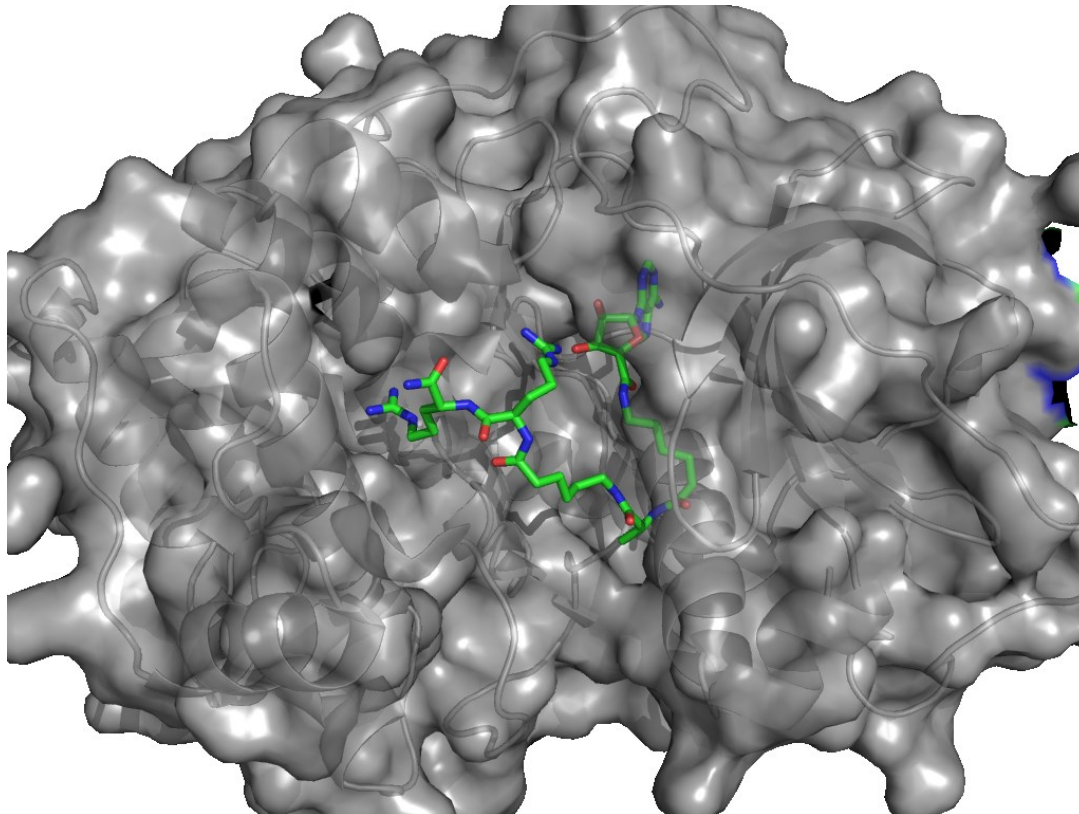


Abbildung 20. Ausschnitt aus der Kristallstruktur der PKA mit ARC-1039 (PDB-Code: 3AGL).^[207] Adenosin ist darin über zwei Ahx-Linker, die wiederum durch ein D-Alanin verknüpft sind, an ein Dipeptid aus D-Arginin gebunden. Das Adenosin Fragment besetzt dabei präzise die ATP Bindetasche und geht die gleichen Wechselwirkungen mit dem Protein ein.^[207]

Die Entwicklung dieser ARCs umfasst bisher drei Generationen und kann in Abbildung 21 nachverfolgt werden.^[218] Die inhibitorische Wirkung der ARCs beschränkt sich dabei nicht nur auf PKA, sondern es werden auch für PKC und ROCK Kinasen sub-mikromolare Affinitäten gemessen.^[225,233]

Einleitung

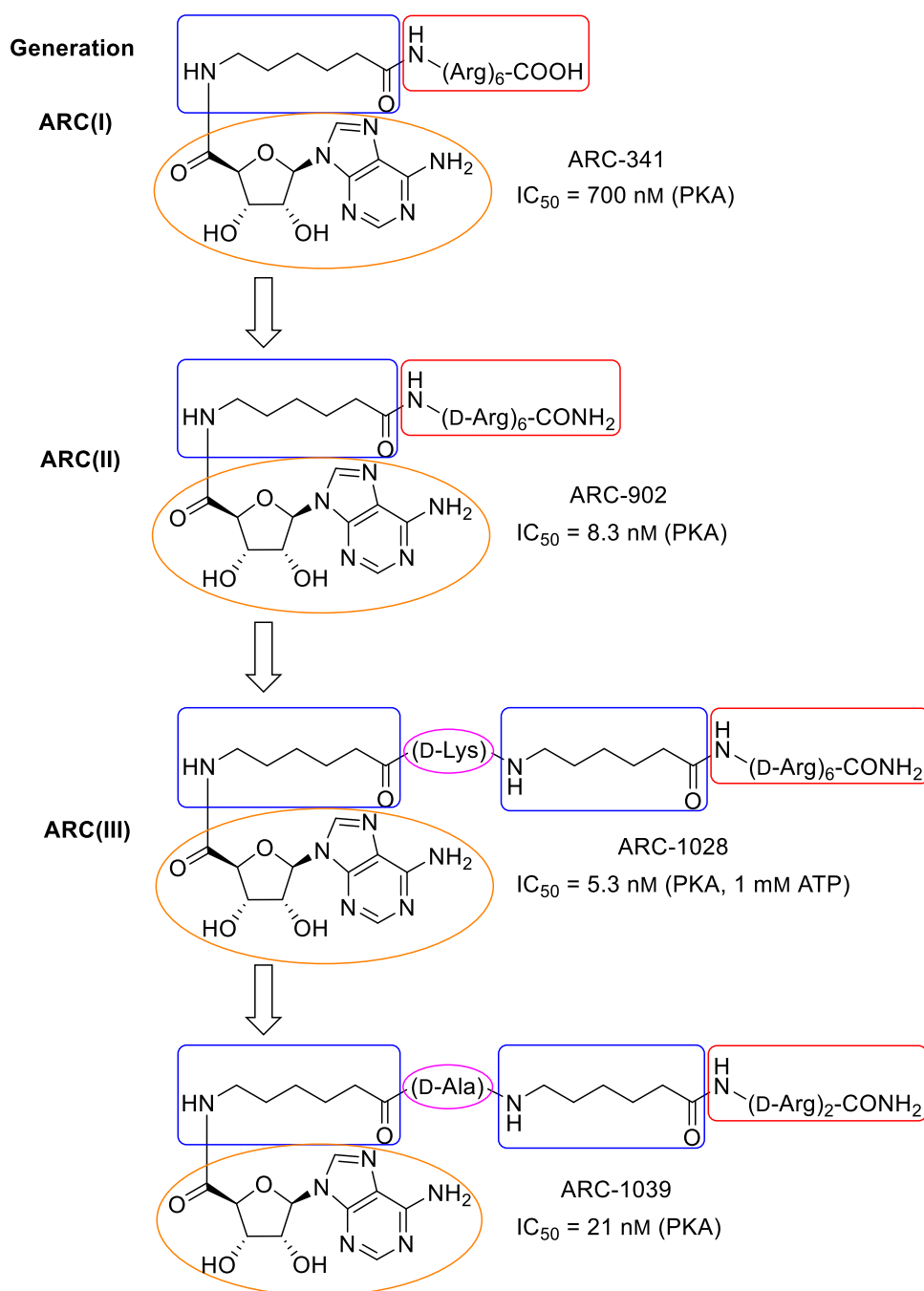


Abbildung 21. Darstellung verschiedener ARC-Typ Inhibitoren Generationen.^[218] Mit blauer Umrandung ist jeweils der flexible Linker/die Linker dargestellt, mit Gelb der nukleosidische Teil der ARCs, mit Pink der chirale Spacer und mit Rot der peptidische Teil. Letzterer besteht aus einem Oligo-arginin Fragment, das die Eigenschaften von Transportpeptiden besitzt und die ARCs zellgängig macht.

ARC-artige Inhibitoren finden bisher Anwendung auf dem Gebiet der Separierung und Aufreinigung von PKA in Form von Affinitätsgelelen auf Sepharose als Trägermaterial^[234] oder in Form von, auf Oberflächenplasmonenresonanz basierenden, Biosensoren.^[235] Auch kann durch Fluoreszenz-Markierung der ARC Inhibitoren das Bindungsverhalten von entsprechenden Proteinkinasen über die Detektion der Fluoreszenz Polarisation untersucht

werden.^[232] Auf zellulärer Basis können ARC Inhibitoren eine regulierende Funktion in Bezug auf die Substrat-Phosphorylierung einnehmen, da sie über Zellplasmamembran stimulierende Eigenschaften verfügen und Proteine in die Zelle transportieren können.^[236] Generell konnten zahlreiche Erfolge auf dem Gebiet der Bisubstrat-Inhibitoren Entwicklung über die letzten 35 Jahre verzeichnet werden. Die anfänglichen Nachteile (hohes Molekulargewicht, Einbau enzymatisch labiler Fragmente) konnten größtenteils behoben werden, lediglich die aufwändige Synthese und die geringe Bioverfügbarkeit, sind Faktoren, die weiterhin kritisch zu bewerten sind. Jedoch weisen Bisubstrat-Inhibitoren auch einige Vorteile auf, so können z. B. Strukturelemente eingebaut werden, die die Zellpermeabilität verbessern und somit den Transport ermöglichen,^[233] oder die proteolytische Stabilität erhöhen.^[237,238] Das Potential von Bisubstrat-Inhibitoren für den Einsatz als diagnostisches oder biochemisches Werkzeug oder als Medikament ist demnach durchaus gegeben und bietet viel Raum für weitere Forschung.^[218]

1.5 Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie

Für eine vollständige Strukturanalyse von Biomolekülen bedarf es einer Methode, die die räumliche Information mit atomarer Auflösung wiedergibt. Diese Informationen können z. B. mittels Röntgenbeugungsexperimenten von Einkristallen der entsprechenden Verbindungen erhalten werden, jedoch setzt dies eine Kristallisation voraus, die in den meisten Fällen nicht ohne weiteres gelingt. Darüber hinaus kann bei der Vermessung von Kristallen keine Aussage über die Flexibilität spezieller Bereiche von Biomolekülen getroffen werden (z. B. Aminosäureseitenketten in Peptiden). Eine weitere Möglichkeit der Strukturaufklärung stellt die CD-Spektroskopie dar, sofern es um die Analyse von größeren Peptiden und Proteinen geht. Mit Hilfe der CD-Spektroskopie ist es möglich, die Anteile der verschiedenen Strukturelemente in einem Protein (Sekundärstruktur) zu bestimmen und Konformationsänderungen zu beobachten.^[239] Jedoch liefert diese Methode lediglich gemittelte Daten über die Struktur und lässt keine genaue Zuordnung der Strukturelemente innerhalb des Peptids/Proteins zu. Zu diesem Zweck kann auf eine andere Methode, die Kernresonanz-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* = NMR), zurückgegriffen werden, welche zumeist eine genauere Strukturanalyse in Lösung ermöglicht. Die Strukturanalyse von Proteinen erfordert aufgrund ihrer Größe zusätzlich eine ¹³C/¹⁵N-Isotopenmarkierung.^[240] Die Strukturaufklärung der in dieser Arbeit enthaltenen Biomoleküle erfolgte anhand der ¹H-NMR-Spektren unter Zuhilfenahme von 2D-spektroskopischen Methoden wie COSY-, TOCSY-, HSQC-, HMBC-, ROESY- und NOESY-Experimenten (Abb. 22).

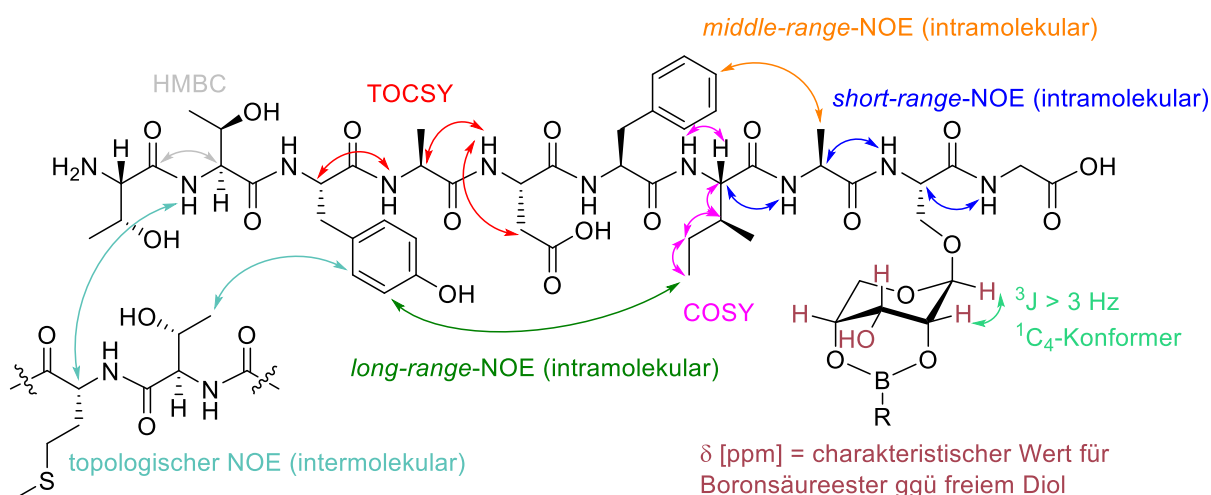


Abbildung 22. Ausschnitt aus dem PKI-Peptid zur Veranschaulichung der Strukturaufklärung anhand verschiedener NMR-spektroskopischer Methoden. Zur Zuordnung der Signale werden speziell die COSY- und TOCSY-Spektren verwendet, welche zum einen nur die skalaren 3J -Kopplungen (COSY, pink) und zum anderen die skalaren Kopplungen über das ganze Spinsystem (TOCSY, rot) aufzeigen. In grau dargestellt ist eine 3J -Kopplung aus der ^1H , ^{13}C -Korrelation, wie sie in HMBC-Spektren detektiert werden kann. Generell können im HMBC-Spektrum 2 - $4J$ -Kopplungen über zwei Spinsysteme beobachtet werden. Die meisten Informationen zur Strukturaufklärung werden aus den NOESY-Spektren erhalten, da dort dipolare Wechselwirkungen über den Raum ermittelt werden. Es werden *short*-, *middle*- und *long-range*-NOEs unterschieden, wobei letztere auch intermolekular auftreten können und als topologische NOEs bezeichnet werden. Im aufgezeigten Beispiel ist ein Ribose-Rest enthalten, welcher ebenfalls mittels NMR-spektroskopischen Charakteristika zur Strukturaufklärung beiträgt. So kann über die $^3J_{1\text{H},2\text{H}}$ -Kopplung eine Aussage über die Konformation des Zuckers getroffen und über die Verschiebung δ der Protonen an Position 2-4 die Stabilität des Boronsäureesters abgeschätzt werden.

Die Verwendung von TOCSY-, HSQC- und HMBC-Experimenten dient zur Messung skalarer Kopplungen und zur Zuordnung der Signale. Zusätzlich gibt ein HSQC-Spektrum Informationen über diastereotopie Protonenpaare z. B. in Peptiden. Die räumliche Strukturanalyse erfolgt anhand der ROESY/NOESY-Experimente, welche, basierend auf dem *Nuclear Overhauser Effect* (NOE), die dipolaren Kopplungen von zwei Protonenkernen durch den Raum misst. Da der Magnetisierungstransfer über den Raum erfolgt und nicht über die Bindungen wie im TOCSY, können Informationen über die dreidimensionale Struktur gewonnen werden. Dabei hängt die Intensität des gemessenen NOEs zwischen zwei Protonen von ihrem Abstand zueinander ab, wobei die Signalintensität mit der sechsten Potenz des Kernabstands der entsprechenden Protonen abnimmt.^[241] Daraus resultiert für Protonen mit kurzen Abständen zueinander ein starkes NOE-Signal und *vice versa*. Es erfolgt weiterhin eine Unterteilung der NOE-Kontakte in sequenzielle (*short-range*), *middle*- und *long-range*-NOEs (max. Abstand: 5 Å), wobei speziell die beiden letztgenannten NOEs zur Strukturaufklärung

dienlich sind.^[242] Die *short-range*-NOEs zeigen den Kontakt zwischen dem αH in der i -Position und dem NH in der $i+1$ -Position und ermöglichen (zusätzlich mit dem intraresidualen NH_i - αH_i NOE-Kontakt) den sogenannten *sequential walk* (siehe Abb. 65) zur Verifizierung der Primärstruktur.

Mittels der $^3J_{\alpha\text{H},\beta\text{H}}$ -Kopplungskonstanten können weitere Informationen in Bezug auf die Struktur von Peptiden erhalten werden. Da eine direkte Korrelation der genannten Kopplungskonstante mit dem ersten Seitenkettenwinkel χ_1 besteht, kann im Falle eines bevorzugt auftretenden Rotamers dieses anhand der Größe der $^3J_{\alpha\text{H},\beta\text{H}}$ -Kopplungskonstante ermittelt werden. Liegen die Werte für die $^3J_{\alpha\text{H},\beta\text{H}}$ -Kopplungskonstanten jeweils bei < 4 Hz, so stehen beide β -Protonen bevorzugt *gauche* zum entsprechenden αH (χ_1 -Winkel = 60°), wohingegen unterschiedliche Werte von < 4 Hz und > 10 Hz durch eine *gauche* und eine antiperiplanare Stellung der αH und βH -Protonen zueinander hervorgerufen werden (χ_1 -Winkel = -60° bzw. 180° ; Abb. 23).^[243]

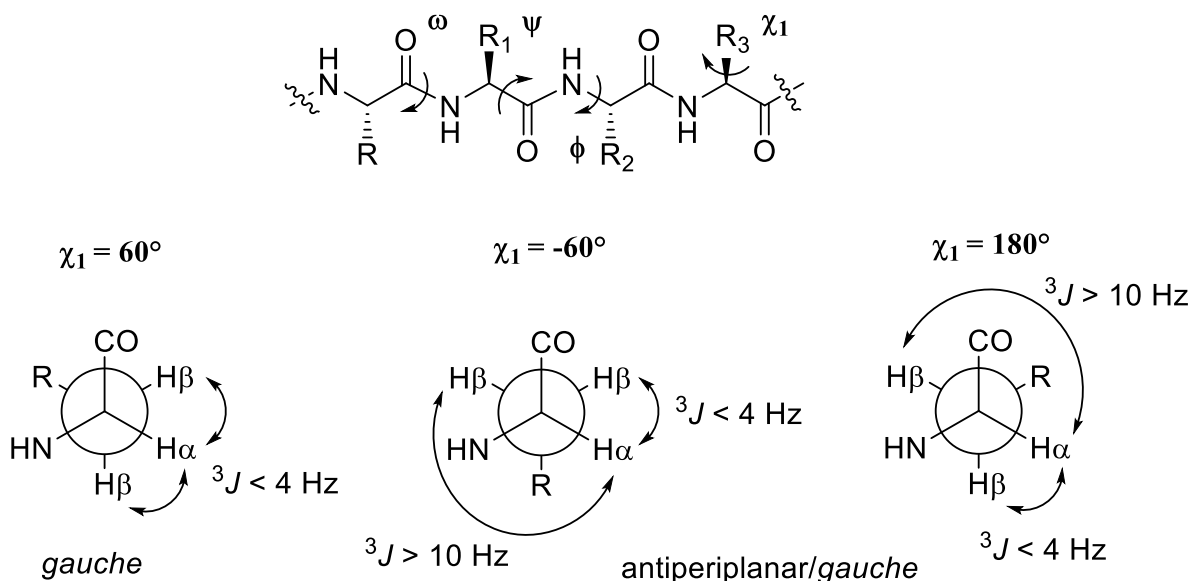


Abbildung 23. Darstellung der Torsionswinkel im Peptidrückgrat und des Seitenkettentorsionswinkels χ_1 sowie der möglichen Seitenkettenrotamere einer α -L-Aminosäure mit den jeweiligen $^3J_{\alpha\text{H},\beta\text{H}}$ -Kopplungskonstanten bei entsprechendem χ_1 -Winkel.

Ein weiterer Parameter zur Strukturaufklärung ist die Identifizierung von intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen durch Messung der Temperaturabhängigkeit der Amidprotonen. Aus den ^1H -NMR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen wird die chemische Verschiebung in ppb/K bestimmt und mit Literaturwerten für Messungen in wässriger Lösung bzw. DMSO verglichen.^[244] Dabei liefern intramolekular wasserstoffbrücken-gebundene

Amidprotonen kleinere Verschiebungen durch ihre geringere Temperaturabhängigkeit (ca. -2 ppb/K), wohingegen amidische Protonen mit einer Wasserstoffbrücke zum Lösungsmittel eine höhere Temperaturabhängigkeit mit Werten zwischen -5 und -10 ppb/K aufweisen.^[245] Generell besteht jedoch bei intramolekularen Wasserstoffbrücken eine starke Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel, weshalb die genannten Werte nicht pauschal auf alle Systeme angewendet werden können.

Damit überhaupt eine Detektion von Amidprotonen erfolgen und die Peptidstruktur in ihrer nativen Form vorliegen kann, müssen die NMR-Experimente in wässrigen Puffersystemen aufgenommen werden. Auch kann dadurch weitestgehend verhindert werden, dass die Peptide Solvens-bedingten Änderungen der Konformation unterliegen. Mit der sogenannten *WATERGATE*-Pulssequenz (*WATER* Suppression by *GrAdient Tailored Excitation*) ist es möglich, niedrig konzentrierte Proben, die große Mengen an Wasser enthalten, ohne einen großen Verlust der Signalintensitäten der α H-Protonen zu messen.^[246] Das undeuterierte Wasser, dessen Signal eine ähnliche chemische Verschiebung wie die α H-Protonen aufweist, kann mit dieser Methode effektiver unterdrückt werden, als z. B. mit der Presat-^[247] oder der *Inversion-recovery*-Methode (IR-Methode).^[248] Die Pulssequenzen der genannten Methoden zur Wasserunterdrückung sind nachfolgend dargestellt.

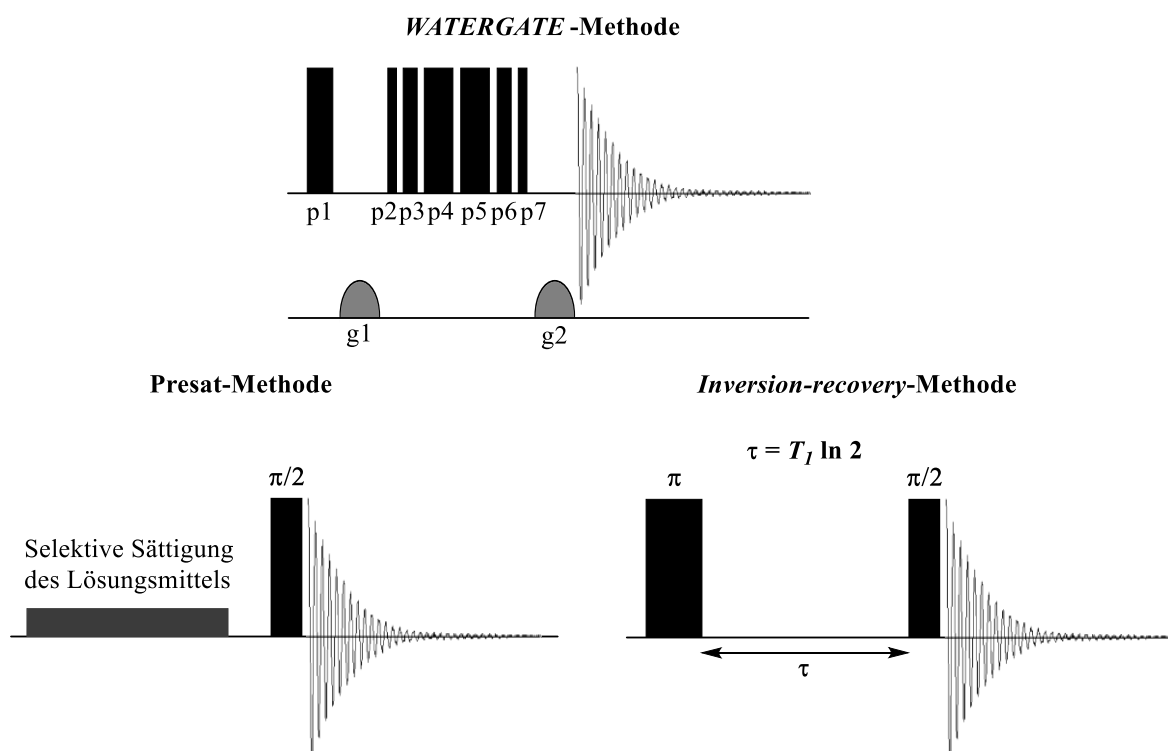


Abbildung 24. Pulsfolgen der drei genannten Methoden zur Wasserunterdrückung. Der abgebildete Pulszyklus der *WATERGATE*-Methode wird auch als „3-9-19 *puls-train*“ bezeichnet und ersetzt die zentrale Pulssequenz aus weichem, hartem und weichem Puls durch eine Binomialsequenz, sodass sich die Kalibrierung der selektiven Pulse erübrigt. Bei der *Presat*-Methode wird ein Puls mit exakt der gleichen Frequenz des Lösungsmittelsignals eingestrahlt, nachdem durch einen langen und schwachen Impuls die Magnetisierung der Lösungsmittelprotonen gesättigt wurde. Nachteil dieser Technik ist die Beeinflussung der Intensität der benachbarten Signale des Wassers. Die *IR*-Methode beruht auf der Signalanregung beim Nulldurchgang der Wassermagnetisierung ($\tau = T_1^{\text{Wasser}} \ln(2)$), jedoch weist auch diese Technik bei hohem Wassergehalt der Probe die gleichen Nachteile auf, wie die *Presat*-Methode, und benötigt darüber hinaus deutlich längere Messzeiten.^[246-249]

Auch für kleinere Biomoleküle als Peptide stellt die NMR-Spektroskopie eine aussagekräftige Analytikmethode in Bezug auf ihre Strukturaufklärung dar. Im speziellen Fall der Zucker Betrachtung kann über die entsprechenden ^1H - und 2D-NMR-Spektren eine genaue Bestimmung der Konformation erfolgen. Besonders unter dem Gesichtspunkt der dynamisch kovalenten Chemie (DCC),^[250] welche in dieser Arbeit zur Verknüpfung der Bisubstrat-Inhibitoren und zur Zyklisierung von Peptiden genutzt wird, spielt die NMR-Spektroskopie eine entscheidene Rolle bei der Reaktionskontrolle bzw. der generellen Verfolgung des Reaktionsgleichgewichts. Da sich die Gleichgewichte in einem dynamisch kovalenten System im Vergleich zu supramolekularen Systemen viel langsamer einstellen, können die verschiedenen Spezies NMR-spektroskopisch nachgewiesen und der Umsatz verfolgt werden (Abb. 25). Dieser Umstand wird sich bei der Analyse der Reaktivität und der Stereoselektivität

der Veresterung von Zuckern mit Boronsäuren zu Nutze gemacht und wird als wichtiger Parameter in dieser Arbeit gehandhabt.

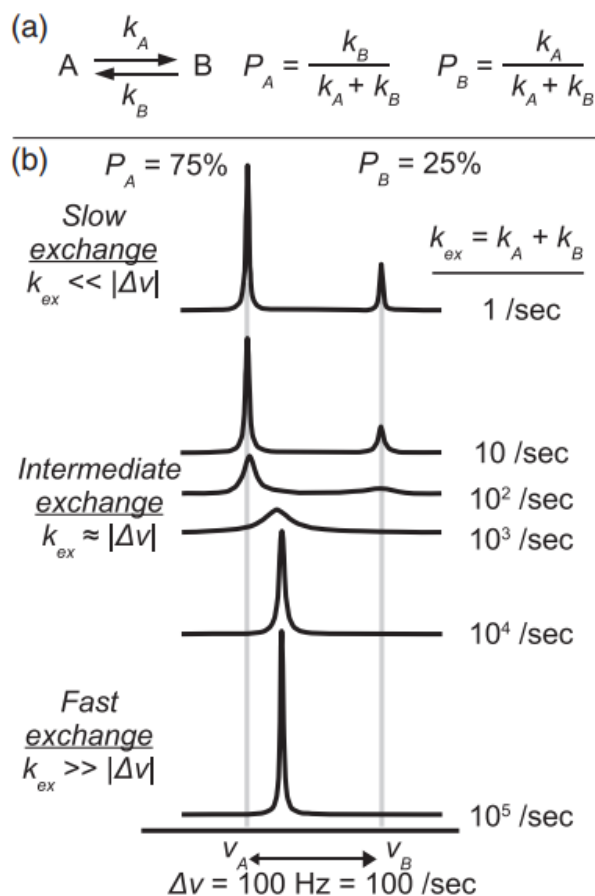


Abbildung 25. Darstellung des chemischen Austauschprozesses. a) Der Austausch zwischen A und B wird über die entsprechende Gleichgewichtskonstante (k_A bzw. k_B) und die jeweilige chemische Verschiebung (ν_A bzw. ν_B) beschrieben. P_A und P_B stellen die beiden Populations-Anteile dar (mit $P_A + P_B = 1$) und k_{ex} steht für die Gesamtaustauschrate. b) Bei langsamem Austausch ($k_{ex} \ll |\Delta\nu|$) werden zwei Signale mit entsprechender chemischer Verschiebung, Intensität und Linienbreite erhalten. Bei mittlerem Austausch ($k_{ex} \approx |\Delta\nu|$) erscheint ein Signal mit gemittelter chemischer Verschiebung und mit, durch die Austausch Verbreiterung, vergrößerter Linienbreite. Durch schnellen Austausch ($k_{ex} \gg |\Delta\nu|$) erscheint nur ein Signal, welches den populationsabhängigen Durchschnitt der chemischen Verschiebung, der Intensität und der Linienbreite widerspiegelt. Der gezeigte Ausschnitt eines NMR-Spektrums geht von $P_A = 75\%$ und $\Delta\nu = 100 \text{ Hz}$ bei unterschiedlichen k_{ex} -Werten aus.^[251]

2. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die reversible Verknüpfung eines Peptidsubstrats mit einem niedermolekularen Inhibitor untersucht werden, die auf einer Veresterung eines Diols mit einer Boronsäure basieren sollte. Dafür war die Identifizierung geeigneter Polyole sowie einer affinen Boronsäure unter den gegebenen Bedingungen notwendig. Aus diesem Grund standen der Einsatz von nicht natürlichen Aminosäuren in Form von Seitenketten *O*- und *S*-glykosylierten Bausteinen mit der pyranoiden Form der Ribose im Fokus dieser Arbeit und sollten in verschiedene peptidische Systeme eingebaut und dessen Einfluss erfasst werden. Das *ax-äq-ax* angeordnete Trihydroxy-Motiv der ribopyranosylierten Aminosäuren bietet dabei ein, bekannterweise, sehr affines Gerüst für die Veresterung mit Boronsäuren, wodurch der Ansatz der reversibel kovalenten Chemie für die Verknüpfung des Substrats mit dem Inhibitor angewendet werden sollte. Das bereits bekannte Inhibitor-System, basierend auf einem Isochinolin-sulfonamid (Fasudil® Derivate), wurde aufgegriffen und für die Synthese der Boronsäure-enthaltenden Inhibitoren genutzt.^[203,252] Die Verknüpfung der Fasudil®-Derivate mit der Boronsäure erfolgte stets über eine reduktive Aminierung zwischen einem primären bzw. sekundären Amin und der Aldehyd Funktion der 2-Formylphenylboronsäure. Für den Einbau der ribopyranosylierten Aminosäuren wurde anhand einer systematischen Variation der Position im PKI-Peptid und der verwendeten Aminosäure vorgegangen. Unter dem Fokus der Bisubstrat-Inhibitor Synthese sollte das bereits weitreichend untersuchte Wirksystem der Proteinkinase A für diesen Ansatz als Templat bzw. als Versuchssystem für andere Kinasen verwendet werden. Es dient sowohl für den Vergleich mit den nahen Verwandten wie PKC und Rho-Kinase, deren Substrate z.B. eine sehr ähnliche Konsensus-Sequenz für die Phosphorylierung aufweisen (PKA: RRXS/T oder KRXXS/T, PKC: RXXS/TXR, Rho-Kinase: RXXS/T oder RXS/T, mit X = beliebige AS).^[253] Die PKA gewinnt jedoch auch selbst immer mehr an Popularität als Ziel für eine kontrollierte Inhibierung. Dies liegt an ihrer umfassenden Beteiligung an zahlreichen Prozessen in lebenden Zellen und den verheerenden Folgen, die eintreten, wenn eine unkontrollierte Aktivierung dieser Kinase erfolgt. Im Bereich der Bisubstrat-Inhibitor Synthese wurden viele Unternehmungen getätigt, einen potenten und vor allem aber spezifischen Inhibitor für die PKA zu finden. Dort verankert ist der Gedanke, eine kovalente Verknüpfung zwischen dem Substrat und einem Inhibitor zu schaffen, sodass eine Steigerung der Affinität erreicht werden kann. In diesem Ansatz wurde jedoch lediglich mit irreversibel verknüpften Bisubstrat-Inhibitoren gearbeitet, die bereits vor der Begegnung mit dem Enzym miteinander verbunden werden mussten. Ein grundsätzliches Schema über die enthaltenen Themen dieser Arbeit ist in Abbildung 26 dargestellt.

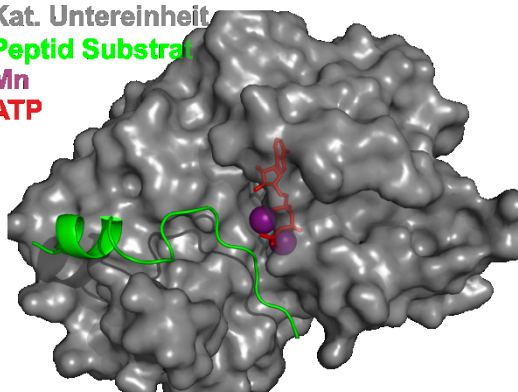
Kristallstruktur PKA (PDB-Code:1ATP)

Kat. Untereinheit

Peptid Substrat

Mn

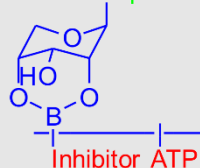
ATP



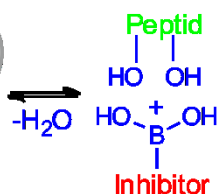
LOEWE Projekt B3

Kat. Untereinheit

Peptid

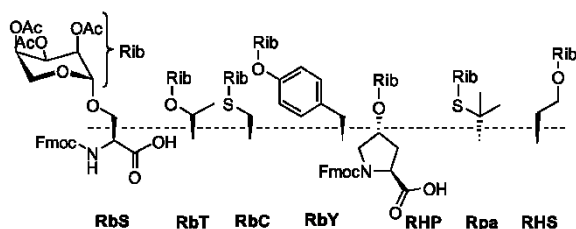


Kovalent reversible
Ligation



Peptid

Modifikation mit
glykosylierten Aminosäuren



ATP/Inhibitor

Bekannte Inhibitorsysteme,
verknüpft mit Boronsäuren

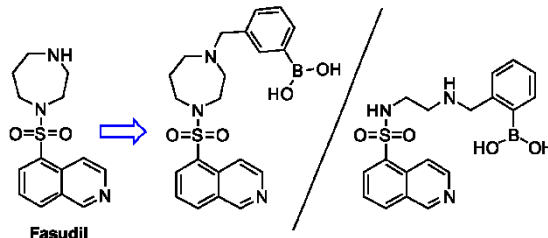


Abbildung 26. Schematische Darstellung des grundlegenden Konzepts dieser Arbeit. Die Proteinkinase A dient als Modellsystem für die Entwicklung neuer Inhibitoren auf der Basis der kovalent reversiblen Chemie. Die Modifizierung findet zum einen am Peptidsubstrat statt, indem eine Aminosäure im Peptid gegen einen glykosylierten Baustein an einer definierten Position ausgetauscht wird. Zum anderen erfolgt eine Verknüpfung eines bekannten Inhibitor-Systems (Fasudil® Derivate) mit einer Boronsäure. Über eine Veresterung unter Freisetzung von Wasser kann die Verknüpfung des Substrats mit dem Inhibitor erfolgen. Es handelt sich hierbei um ein, vom Land Hessen gefördertes Forschungsprogramm, das unter dem Namen „LOEWE“ eine Kooperation verschiedener, naturwissenschaftlicher Fachbereiche hessischer Universitäten ermöglicht.

Darüber hinaus sollten diverse andere Versuche unternommen werden, um sowohl ribopyranosylierte Aminosäuren als auch Boronsäuren in peptidische Systeme zu integrieren. Dafür sollten zumeist kurze, dem Arbeitskreis bereits bekannte Peptidsequenzen, wie der β -hairpin des Foldons, der von DR. MATTHIAS KÖRLING sehr gründlich NMR-technisch untersucht wurde, verwendet werden.^[309] In diese Peptidsequenzen werden Boronsäuren mit Carboxy-Funktion entweder terminal, durch eine gängige Peptidkupplungsmethode, eingebracht, oder über das Seitenketten-Amin einer basischen Aminosäure (hier: Lysin/Ornithin) gekuppelt. Außerdem sollten Versuche unternommen werden, Phenylalanin in *para*-Position mittels einer MIYaura-Borylierung mit einer Boronsäure-Funktion zu modifizieren, um die Integration einer Boronsäure an einer beliebigen Stelle im Peptid zu ermöglichen (Abbildung 27).

Aufgabenstellung

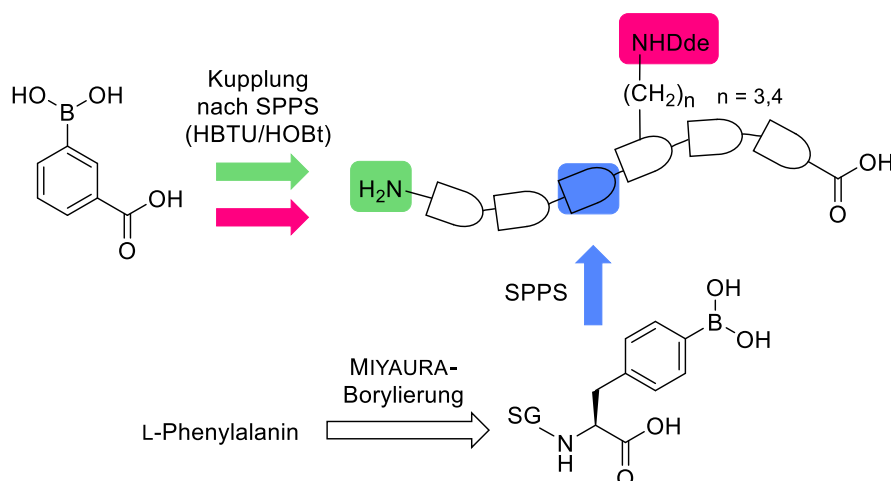


Abbildung 27. Einbringung von Boronsäuren in peptidische Systeme. In grün dargestellt ist die terminale Einführung der 3-Carboxyphenylboronsäure im Anschluss an die Peptidsynthese. Die Seitenketten-Modifizierung des Lysins/Ornithins erfolgt unter gängigen Kupplungsbedingungen nach der Dde-Entschützung an der festen Phase mit 2 %iger Hydrazin-Lösung in DMF. Die Integration der Boronsäure in das Peptid-Rückgrat wird durch den Einbau einer entsprechend modifizierten Aminosäure (hier: 4-Borono-Phenylalanin) durch SPPS ermöglicht.

Dies sollte im weiteren Verlauf zum einen dazu dienen, andere Peptide mit ribopyranosylierten Bausteinen in der Sequenz kovalent reversibel binden zu können, um die Verknüpfung zwischen zwei unterschiedlichen Peptiden zu ermöglichen. Zum anderen sollte überprüft werden, ob bei gleichzeitigem Einbau einer ribopyranosylierten Aminosäure und einer Boronsäure in einem Peptid, eine intramolekulare Zyklisierung durch die Veresterung eintreten kann.

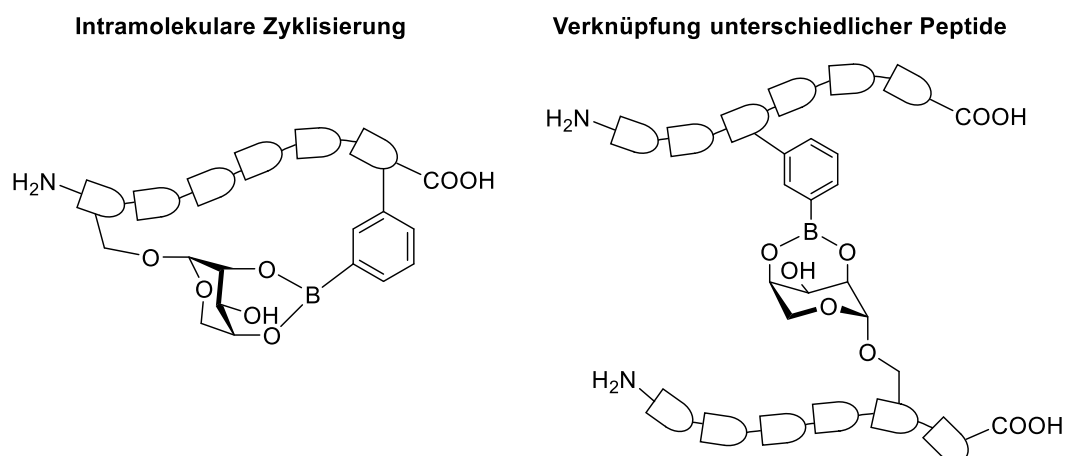


Abbildung 28. Verschiedene Verknüpfungsmöglichkeiten von ribopyranosylierten Aminosäuren mit Boronsäuren innerhalb peptidischer Systeme.

Außerdem wurde mittels SUZUKI-MIYAUURA-Reaktion ein Biphenylalanin Baustein (Bip) hergestellt, dessen Einfluss auf die β -hairpin Stabilität des Foldons durch Einbau anstelle des Tyrosins in der Peptidsequenz untersucht werden sollte.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthese und Verwendung der glykosylierten Aminosäurebausteine

Aus der Vielzahl von Zuckern trägt nur die pyranoid Form der Ribose das gewünschte *ax-äq-ax*-Bindungsmotiv, sodass eine Glykosylierungsmethode gefunden werden musste, bei welcher sowohl die Bildung der furanoiden Form, als auch die Anomerisierung des Zuckers unterdrückt werden. Es konnten sieben Aminosäuren mit Hydroxy bzw. Thiol-Funktion in der Seitenkette durch Glykosylierung mit tetraacetylierter Ribopyranose zu den entsprechenden, *N*-Fmoc und *O*-Acetyl geschützten, ribopyranosylierten Aminosäuren (RAS) umgesetzt werden. Bei den verwendeten Aminosäuren handelte es sich um die proteinogenen Aminosäuren: Serin, Threonin, Tyrosin und Cystein, die in Anlehnung an den Dreibuchstabencode benannt werden konnten (RbS **1** für ribopyranosyliertes Serin und analog für RbT **2**, RbC **3**, RbY **4**) und die nicht-proteinogenen Aminosäuren: Hydroxyprolin, D-Penicillamin und Homoserin (RHp **5**, Rpa **6**, RHs **7**). Da für die drei nicht-proteinogenen Aminosäuren kein Einbuchstabencode existiert, wurden zwei Buchstaben für die Identifizierung des Aminosäure-Precursors benötigt, wobei der zweite Buchstabe durch die Groß- bzw. Kleinschreibung die Information der Konfiguration angibt (Abbildung 29).

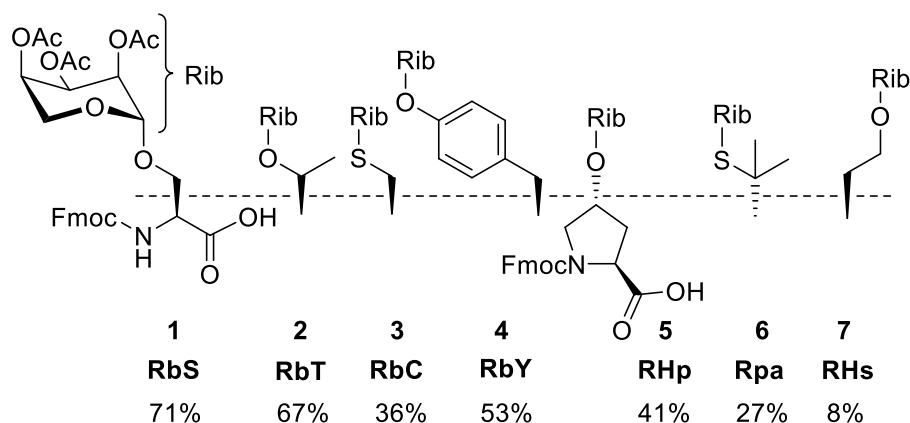
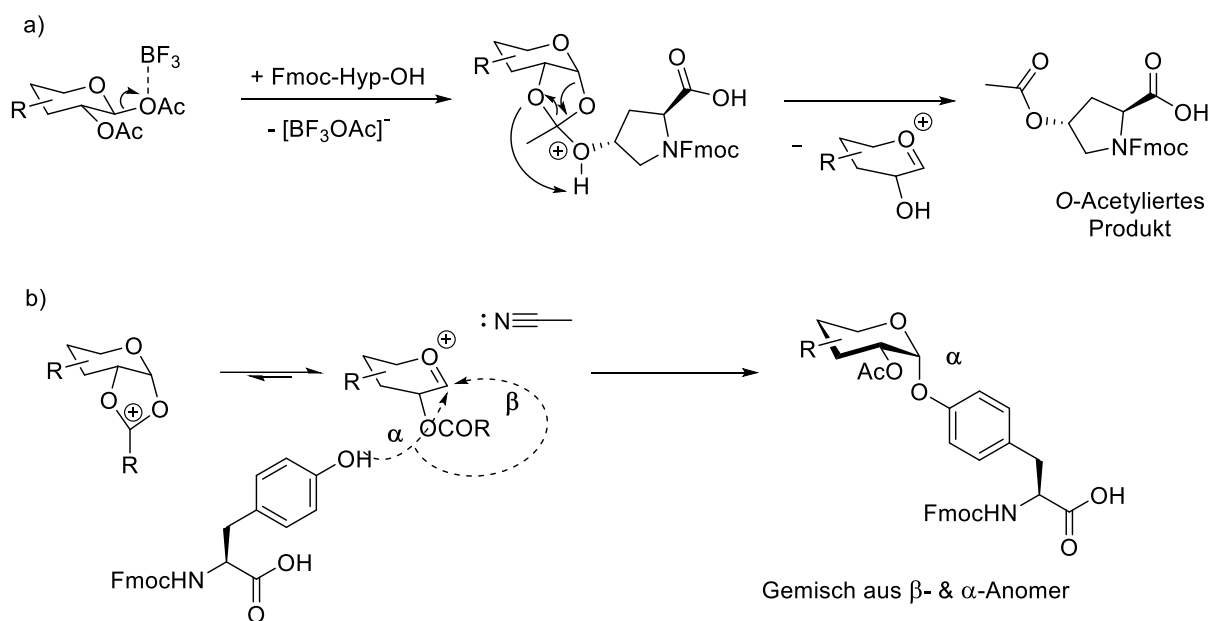


Abbildung 29. Übersicht der synthetisierten ribopyranosylierten Aminosäuren und deren Benennung, sowie die erzielten Ausbeuten.

Die Synthese der glykosylierten Bausteine erfolgte durch Reaktion der anomeren Acetylgruppe der Ribopyranose unter Lewis-Säure Aktivierung mit den entsprechenden *O*- bzw. *S*-Nukleophilen (siehe Kapitel 1.2.3.1). Für die jeweiligen Aminosäuren wurden verschiedene Reaktionsbedingungen verwendet, wobei die Lewis-Säure (TMSOTf, SnCl₄, BF₃ x Et₂O), das Lösungsmittel (DCM, MeCN), sowie Temperatur und die Reaktionszeit variiert wurden, um mögliche Nebenreaktionen zu unterdrücken und die Ausbeuten in akzeptable Bereiche zu

lenken. Häufig konnten die Ursachen für die teils niedrigen Ausbeuten gefunden werden, da diese zum Teil bereits aus anderen Glykosylierungsreaktionen literaturbekannt waren.^[53] So kommt es z. B. häufig zur Übertragung der Acetyl-Gruppe, indem der gebildete Orthoester sich unter *O*-Acetylierung der Aminosäure umlagert (Schema 7a). Dies konnte vermehrt bei der Umsetzung des Hydroxyprolins verzeichnet werden. Auch konnte die Bildung des α -Anomers bei manchen Glykosylierungsreaktionen beobachtet werden (speziell bei Tyrosin und Cystein), was laut Literatur auf die Stabilisierung des Oxocarbenium Ions durch die Verwendung von Acetonitril zurückzuführen ist (Schema 7b).^[53]



Schema 7. Literaturbekannte Nebenreaktionen bei Glykosylierungen. A) Der gebildete Orthoester liefert unter Umlagerung das *O*-acetylierte Hydroxyprolin. B) Durch die Stabilisierung des Oxocarbenium Ions durch das Lösungsmittel Acetonitril kommt es zur Bildung eines Gemisches des α - und β -Anomers (hier am Beispiel des Tyrosins).

Eine weitere Nebenreaktion trat bei der Umsetzung des Homoserins auf, welches im Zuge der Aktivierung mit Lewis-Säure eine Lactonisierung vollzog und das zyklische Homoserin lieferte. Somit ist die niedrige Ausbeute des RHs von nur 8% auf die Bildung des Lactons zurückzuführen, welches in großen Mengen isoliert werden konnte. Die schlechten Ausbeuten bei der Glykosylierung des Penicillamins wurden auf die generelle Reaktionsträgheit des Edukts bezogen. Auch die Verwendung stärkerer Lewis-Säuren, die Erhöhung der Temperatur und die Verlängerung der Reaktionszeit konnten die Ausbeuten nicht steigern, und es wurde zumeist ein Großteil der Edukte zurückgewonnen. Alles in allem konnten stets (außer im Falle des Homoserins) ausreichende Mengen an Produkt der entsprechenden Fmoc-geschützten, ribopyranosylierten Aminosäure erhalten werden, um diese in der Festphasenpeptidsynthese zu

verwenden. Eine Zusammenstellung der ^1H -NMR-Spektren aller erhaltenen Fmoc-Bausteine (außer RHs) ist in Abbildung 30 gezeigt.

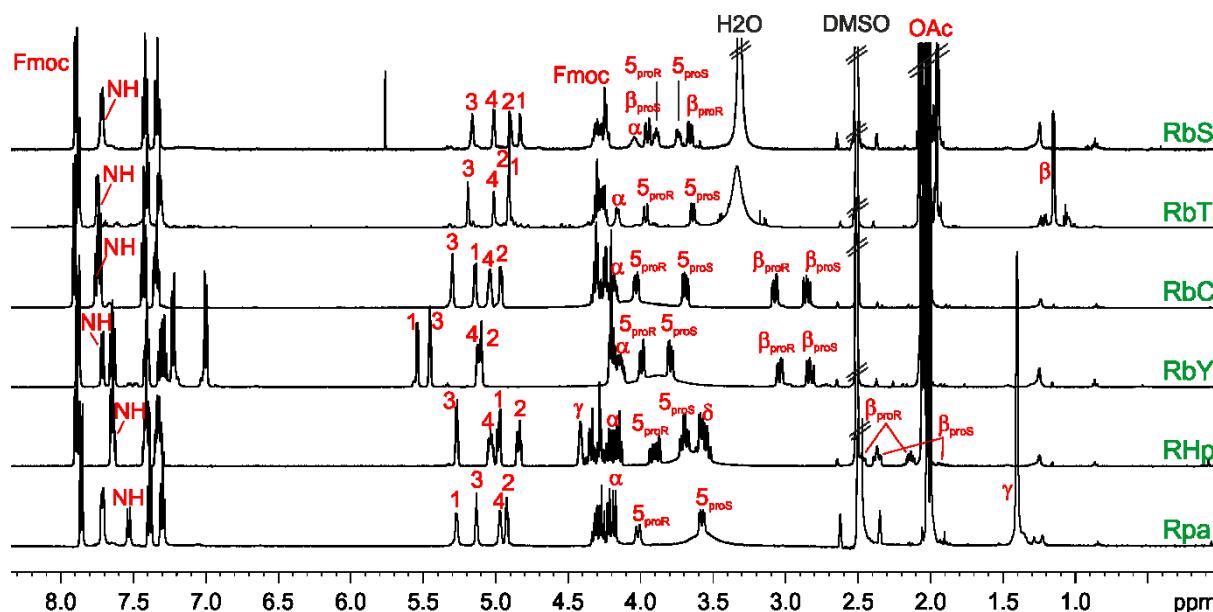


Abbildung 30. Übersicht der ^1H -NMR-Spektren (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6) aller synthetisierten Fmoc-RAS. Die Signale sind in rot markiert, die arabischen Nummern beschreiben den Ribosyl-Rest (1 = anomeres Proton). Prochirale β -Protonen sind als solche markiert.

Die Zuordnung der Signale im ^1H -NMR-Spektrum erfolgte mithilfe von 2D-Spektren, die prochiralen β -Protonen konnten mittels der $^3J_{\text{H}\alpha\text{-H}\beta}$ Werte und den erhaltenen NOE-Daten unterschieden werden. Die Zucker-Signale waren stets in einem Bereich von 5.9-4.8 ppm zu finden und das Signal des anomeren Protons konnte in jedem Spektrum (außer bei RHp) als Duplett erfasst werden. Im Fall des Hydroxyprolins wurden aufgrund der vorhandenen cis/trans-Isomerie zwei Dupletts erhalten. Eine zusammenfassende Tabelle über die Kopplungskonstanten der prochiralen Protonen der verschiedenen RAS-Bausteine im Zustand der Fmoc-Aminosäure, im Tetrapeptid und im Boronsäure-gebundenen Tetrapeptid ist nachfolgend dargestellt. Da aufgrund einer Vielzahl von Signalen im aliphatischen Bereich oft Signalüberlappungen auftraten, konnten einige Kopplungskonstanten nicht abgelesen werden (mit x markiert). Zum Vergleich sind auch die beiden *O*- und *S*-Acetat geschützten Bausteine der Ribose aufgeführt. Anhand dieser Kopplungskonstanten und den Signalintensitäten in den entsprechenden ROESY-Spektren war eine Zuordnung der Seitenkettenrotamere nur bedingt möglich.

Tabelle 3. Übersicht der aus den ^1H -NMR-Spektren abgelesenen Kopplungskonstanten der prochiralen Protonen.

| | $^3J_{\alpha\text{H},\beta\text{H}}$ | $^3J_{\alpha\text{H},\beta\text{H}}$ | $^3J_{5\text{H},4\text{H}}$ | $^3J_{5\text{H},4\text{H}}$ | Rotamer |
|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|
| | <i>proR</i> | <i>proS</i> | <i>proR</i> | <i>proS</i> | |
| Rib(OAc)₄ 8 | x | x | 5.30 | 3.10 | x |
| Rib(OAc)₃(SAc) 9 | x | x | 4.00 | 7.40 | x |
| RbS 1 | 6.00 | 3.00 | 4.00 | 2.40 | gemittelt |
| RbS-Tetrapeptid P1 | 6.50 | 3.70 | 6.50 | 3.60 | gemittelt |
| RbS-Tetrapeptid + Boronsr. P7 | x | 4.20 | x | 2.80 | x |
| RbT 2 | x | x | 2.30 | 3.40 | x |
| RbT-Tetrapeptid P2 | x | x | 3.00 | 6.30 | x |
| RbT-Tetrapeptid + Boronsr. P8 | x | x | x | x | x |
| RbC 3 | 9.50 | 4.60 | 3.60 | 6.70 | -60° |
| RbC-Tetrapeptid P3 | 8.70 | 5.70 | 3.40 | 7.20 | -60° |
| RbC-Tetrapeptid + Boronsr. P9 | 9.60 | 5.00 | 2.30 | x | -60° |
| RbY 4 | 10.70 | 4.30 | 3.20 | 5.40 | -60° |
| RbY-Tetrapeptid P4 | 9.50 | 4.30 | x | x | -60° |
| RbY-Tetrapeptid + Boronsr. P10 | 9.60 | 4.30 | x | x | -60° |
| RHp 5 | x | x | 3.40 | 5.70 | x |
| RHp-Tetrapeptid P5 | 7.70 | 4.30 | 4.10 | 4.70 | x |
| RHp-Tetrapeptid + Boronsr. P11 | x | x | 3.80 | x | x |

Für die Aufreinigung der Bausteine diente grundsätzlich die Säulenchromatographie mit Silicagel (RbS und RbT) bzw. die semipräparative HPLC (alle anderen RAS), sodass alle Bausteine mit Reinheiten zwischen 96 und 99 % für den Einsatz in der Festphasenpeptidsynthese erhalten werden konnten.

An dieser Stelle sei noch auf das Auftreten zweier, im konformationellen Gleichgewicht vorliegender Formen der Ribopyranose, hingewiesen, welche die Kopplungskonstante des anomeren Protons maßgeblich beeinflussen. Bereits im Jahre 1969 stellten DURETTE und HORTON während einer NMR-Tieftemperaturmessung der Tetraacetyl-geschützten Ribopyranose bei 188 K fest, dass nach Überschreiten der Koaleszenztemperatur von 213 K zwei Signalsätze für das anomere Proton auftraten.^[254] Bei dem oberhalb von 213 K vorliegenden Signal handelt es sich um ein zeitlich gemittelttes Signal des anomeren Protons, welches bei Temperaturen unterhalb der Koaleszenz und somit bei Unterschreitung der Energiebarriere der

Isomerisierung in Form zweier Signale das Vorkommen beider Konformere zeigt. Der damals berechnete Wert für die Energiebarriere $\Delta G^{\ddagger 0}$, der einem Übergang zwischen den Konformeren entspricht, wurde erneut berechnet und mit den Werten aus der vorangegangenen Masterarbeit verglichen. Mit 9.5 kcal/mol liegt dieser Wert sehr nah an dem von DURETTE und HORTON veröffentlichten Wert.^[254] Die Konformere werden anhand ihrer Sesselkonformation in die 1C_4 - und die 4C_1 -Form unterschieden (Abbildung 31).

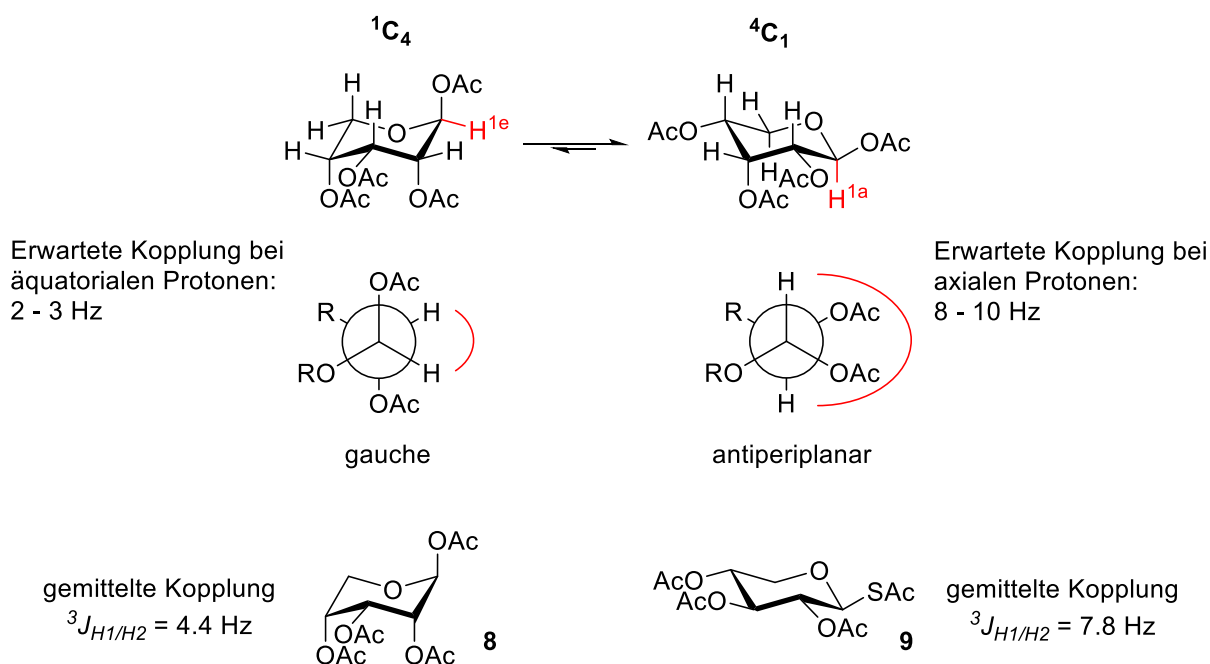


Abbildung 31. Konformationelles Gleichgewicht der Tetraacetylribopranose **8**. Anhand der *Newman*-Projektion kann eine Einschätzung über die zu erwartende vicinale Kopplungskonstante des anomeren Protons getroffen werden. Für die Tetraacetylribopranose wird bei Raumtemperatur eine gemittelte ${}^3J_{H1,H2}$ -Kopplung von 4.4 Hz gemessen. Für das entsprechende 1-Thioacetat **9** ergibt sich ein Wert von 7.8 Hz.

In der 1C_4 -Konformation steht das anomere Proton in äquatorialer Position, sodass sich eine gauche Kopplung mit der vicinalen Kopplungskonstante von 1-3 Hz, ergibt. Dagegen liefert das axial stehende Proton in der 4C_1 -Konformation durch die antiperiplanare Stellung eine 3J -Kopplung zwischen 8-10 Hz.^[255] Da der gemittelte Wert der Tetraacetyl-geschützten Ribopyranose **8** bei 4.4 Hz liegt, lässt sich daraus anhand folgender Formel I ein Konformeren-Verhältnis von 2:1 ${}^1C_4/{}^4C_1$ berechnen.

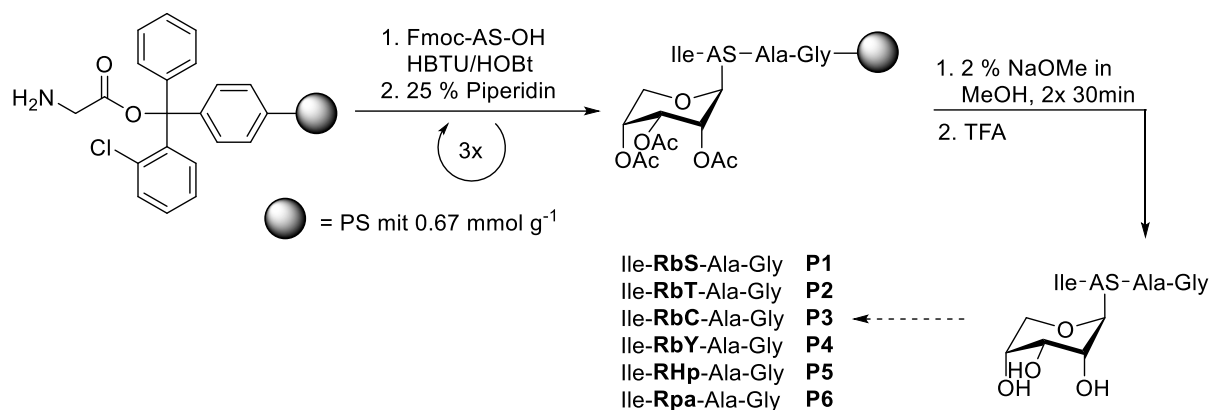
$$\begin{array}{ccc}
 \text{H}_{\text{eq.}} \triangleq {}^1\text{C}_4 & & \text{H}_{\text{ax.}} \triangleq {}^4\text{C}_1 \\
 & \nwarrow \quad \nearrow & \\
 {}^3J = x \cdot 2.0 \text{ Hz} + y \cdot 8.5 \text{ Hz} & & \\
 \text{mit } y = (1 - x) & & \\
 x = \frac{{}^3J - 8.5}{-6.5} & &
 \end{array} \tag{I}$$

Abbildung 32. Vorgeschlagene Formel für die Berechnung des ${}^1\text{C}_4$: ${}^4\text{C}_1$ Verhältnisses der Konformere.

Weiterhin wurde zum Vergleich das entsprechende 1-Thioacetat der Ribopyranose **9** synthetisiert, um den Einfluss des Schwefels gegenüber dem Sauerstoff am anomeren Zentrum in Bezug auf den exoanomeren Effekt zu untersuchen. Für eine detaillierte Untersuchung des Thio-Derivats wurde analog eine Tieftemperaturmessung durchgeführt, bei welcher für das ${}^1\text{C}_4$ -Konformer eine Kopplungskonstante von 1.8 Hz und für das ${}^4\text{C}_1$ -Konformer ein Wert von 8.8 Hz erhalten wurde. Der gemittelte Wert konnte mit 7.8 Hz aus dem ${}^1\text{H}$ -NMR-Spektrum abgelesen werden, sodass sich ein Konformeren-Verhältnis von 1:7 für ${}^1\text{C}_4$ zu ${}^4\text{C}_1$ ergab. Die Formel wird in den späteren Kapiteln erneut für die Berechnung des Verhältnisses der Konformere eingesetzt werden.

3.1.1 Verwendung glykosylierter Aminosäuren in der Festphasenpeptidsynthese

Die synthetisierten RAS wurden anschließend in der standardisierten Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc-Strategie eingesetzt und in eine willkürlich gewählte Tetrapeptidsequenz eingebaut. Um die NMR-Analyse zu erleichtern, wurden vier verschiedene Aminosäuren gewählt, deren genaue Sequenzabfolge Ile-RAS-Ala-Gly war. Die Synthese erfolgte an einem 2-Chlortrityl-chlorid Polystyrol Harz (2-CTC PS), welches mit Glycin vorbeladen wurde. Die Fmoc-Entschützung wurde mit 25 %iger Piperidin Lösung in DMF durchgeführt und für die Kupplungen der jeweiligen Aminosäure (3 Äquivalente) wurde mit je drei Äquivalenten HBTU/HOBt aktiviert und mit DIPEA (8 Äquivalente) in DMF für eine Stunde gekuppelt. Die Deacetylierung des Zuckers erfolgte nach der letzten Kupplung mit 2 %iger NaOMe-Lösung in Methanol für 30 min (2x) und nach der finalen Fmoc-Entschützung und Abspaltung vom Harz konnte das jeweilige Peptid mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt werden. Eine Übersicht der beschriebenen Abläufe ist in Schema 8 gezeigt.



Schema 8. Schematische Übersicht der Standard Fmoc-Festphasenpeptidsynthese mit Einbau der RAS an Position 2 der jeweiligen Tetrapeptide **P1-P6**. Nach der Deacetylierung des Zuckers am Harz mit 2 %iger NaOMe-Lösung erfolgt die Abspaltung vom Harz mit TFA.

Die mittels Festphasenpeptidsynthese generierten Tetrapeptide **P1-P6** wiesen bereits nach dem Fällen eine gute Reinheit auf (74 - 92%), wodurch bei allen verwendeten Bausteinen davon ausgegangen werden kann, dass sie für den Einsatz in der manuellen Festphasenpeptid-synthese geeignet sind. Auch der Einsatz in der automatisierten Festphasenpeptidsynthese wurde zu einem späteren Zeitpunkt erprobt und lieferte gleichermaßen keine Deletionsmutanten. Die übereinandergelegten ¹H-NMR-Spektren der jeweiligen Tetrapeptide sind in Abbildung 33 aufgeführt.

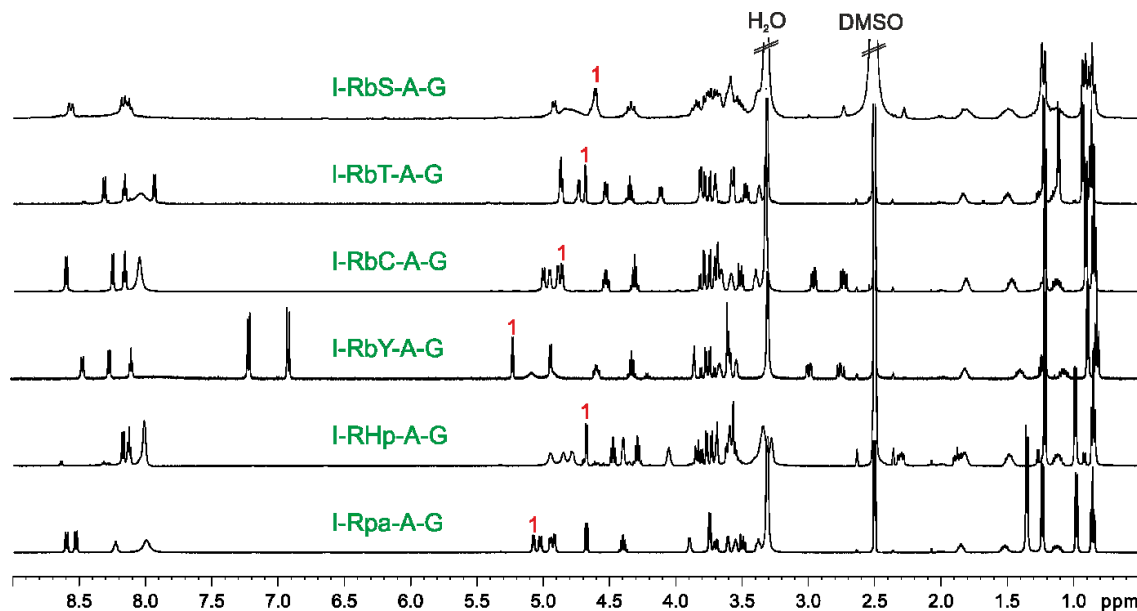


Abbildung 33. Übersicht der ¹H-NMR-Spektren (500 MHz, 300 K, DMSO_{d6}) aller synthetisierten Tetrapeptide mit den jeweiligen RAS-Bausteinen **P1-P6**. Das anomere Proton ist stets mit einer roten 1 markiert und liegt in einem Bereich zwischen 5.3 und 4.6 ppm.

Im Vergleich zu den Fmoc- und Acetyl-geschützten RAS-Bausteinen befindet sich das anomere Proton in den Tetrapeptiden in einem kleineren ppm-Bereich. Es konnte bei allen Tetrapeptiden die Kopplungskonstante des Dupletts ($^3J_{\text{H},2\text{H}}$) ermittelt werden, um sie mit den Werten der Aminosäure Bausteine zu vergleichen. Ein weiterer Wert, der für einen Vergleich herangezogen wurde, stammt aus dem jeweiligen Veresterungsprodukt der Tetrapeptide mit Pyrenboronsäure. Die Vorgehensweise für den Erhalt der Boronsäureester und eine Beschreibung der Beobachtungen aus den ^1H -NMR-Spektren sind dem nachfolgenden Kapitel zu entnehmen.

3.1.2 Boronsäureveresterung der Tetrapeptide

Der Ribopyranosyl-Rest der Aminosäure Bausteine bietet mit seinem Trihydroxy Motiv in *ax-äq-ax* Stellung eine, bekannterweise, sehr affine Anbindungsstelle für eine Veresterung mit Boronsäuren. Bereits im Jahre 1913 berichtete BÖESEKEN *et al.* von der hohen Veresterungstendenz von 1,2- und 1,3-Diolen mit Boronsäuren.^[256,257] Da bisher lediglich die furanoide Form der Ribose für Studien zur Veresterung mit Boronsäuren verwendet wurde, lag das Hauptaugenmerk dieser Arbeit auf der Untersuchung der Ribopyranose zur reversiblen Verknüpfung zwischen einer Boronsäure und einem Zucker. Hinzu kommt die generelle Vielseitigkeit des Zuckers in seiner Funktion als Ligand, da er sowohl neutrale als auch kationische oder anionische Komplexe bilden kann (Abb. 34).

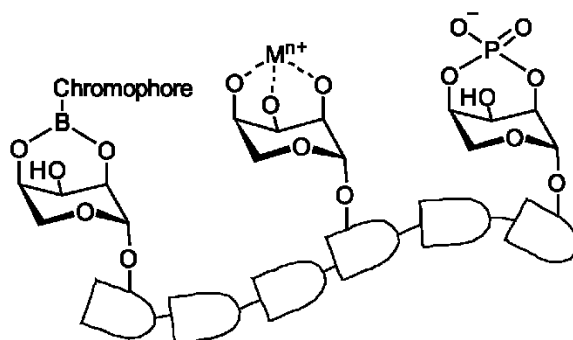


Abbildung 34. Darstellung verschiedener Komplexierungsmöglichkeiten mit Ribopyranose. Durch die Veresterung des Zuckers mit Boronsäuren können neutrale Komplexe erhalten werden (hier unter Einführung eines Chromophors). Mit Metallen, wie Ca^{2+} , Y^{3+} oder La^{3+} , können kationische Komplexe, mit z.B. Phosphaten anionische Komplexe gebildet werden.

In diesem Kapitel soll zunächst die Boronsäureveresterung unter Bildung neutraler Komplexe vorgestellt werden. Diese Ligation wurde bereits vielseitig angewandt, um unter anderem Fluorophore (z.B. Pyrenboronsäure) an Saccharide anzubringen, was die Messung von Excimer Emission oder den Einsatz für den photoinduzierten Elektronentransfer (PET) ermöglicht.^[18,258]

Die Hintergründe der Boronsäureveresterung in dieser Arbeit werden zu einem späteren Zeitpunkt erläutert, da zunächst auf die generellen Beobachtungen aus den ^1H -NMR-Spektren eingegangen werden soll, die im Zuge der Veresterung eintreten und auf eine konformationelle Änderung des Zuckers hinweisen.

Die Boronsäureveresterungen wurden stets im NMR-Maßstab durchgeführt, da durch die NMR-Analyse bereits eine Aussage über die Vollständigkeit der Veresterung getroffen und auch detaillierte Informationen über die Konformation des Zuckers erhalten werden konnten. Für die NMR-Experimente wurde das jeweilige Glykopeptid ($\geq 1 \mu\text{M}$) und eine äquimolare Menge der Boronsäure (hier Pyrenboronsäure) in 0.6 mL trockenem DMSO-d_6 gelöst und direkt nach dem Mischen NMR-spektroskopisch vermessen. Die Messung wurde nach einigen Stunden bzw. einigen Tagen wiederholt. Im Falle einer unvollständigen Veresterung aufgrund eines nicht äquimolaren Verhältnisses zwischen Zucker und Boronsäure wurde dies entsprechend angepasst und erneut vermessen. Die Veresterung wurde als vollständig angesehen, wenn das Signal des anomeren Protons des unkomplexierten Tetrapeptids nicht mehr im Spektrum zu finden war. Die ^1H -NMR-Spektren der verschiedenen, mit Pyrenboronsäure veresterten Tetrapeptide **P7-P12** sind in Abbildung 35 gezeigt.

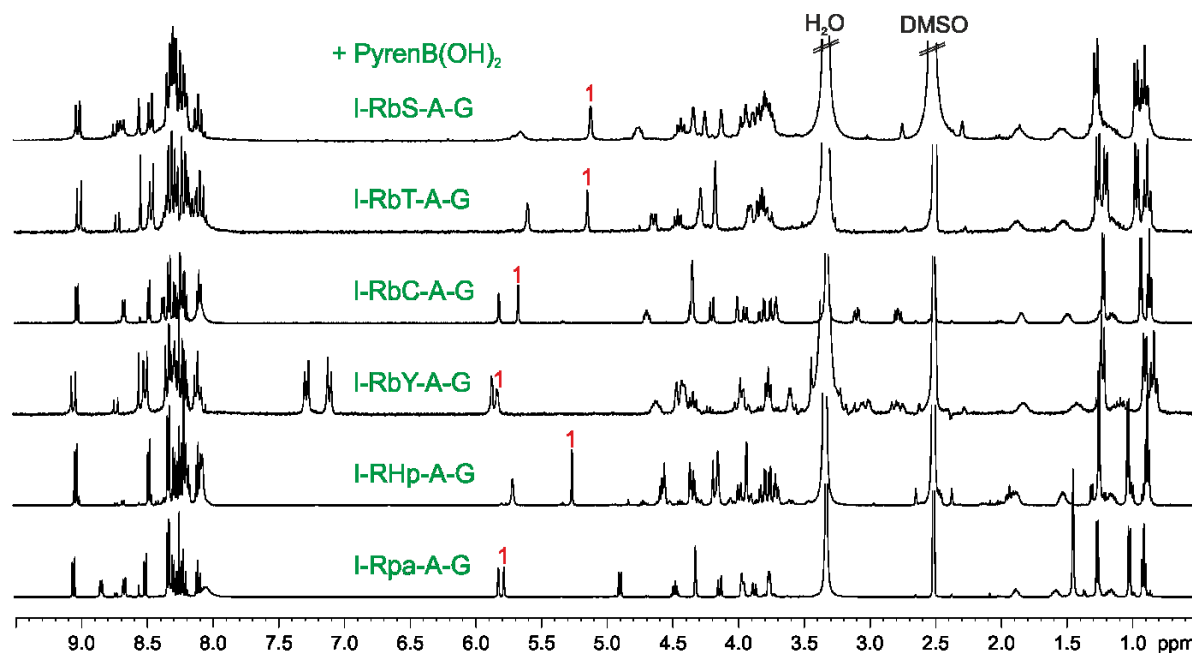


Abbildung 35. Übersicht der ^1H -NMR-Spektren (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6) aller, mit Pyrenboronsäure veresterten Tetrapeptide **P7-P12**. Das anomere Proton ist stets mit einer roten 1 markiert und liegt in einem Bereich zwischen 5.9 und 4.8 ppm.

Es war zu beobachten, dass eine deutliche Tieffeld-Verschiebung für das anomere Proton auftrat, was mit einer Verkleinerung der Kopplungskonstante des Dupletts einherging. In dieser Beobachtung liegt der große Vorteil der Verwendung von Ribopyranose, da der Endpunkt des

Veresterungsprozesses NMR-spektroskopisch terminiert werden kann, trotz der generellen Abhängigkeit des chemischen Shifts von zahlreichen Parametern (Lösungsmittel, Temperatur, pH-Wert). Die Kopplungskonstante des anomeren Protons kann in diesem Fall eine genaue Auskunft über das konformationelle Verhältnis des Zuckers geben (Formel I aus Kapitel 3.1). Darüber hinaus bietet lediglich das ${}^1\text{C}_4$ -Konformer der Ribopyranose das diaxiale Diol-Bindungsmotiv für die Veresterung mit Boronsäuren. Daraus resultierend verringert sich die Kopplungskonstante des anomeren Protons im Zuge der Veresterung mit dem ${}^1\text{C}_4$ -Konformer (${}^3J < 2.0$ Hz). Weiterhin erfährt das Signal des anomeren Protons eine Tieffeld Verschiebung um durchschnittlich ~ 0.56 ppm. Der Zusammenhang zwischen der Kopplungskonstante des anomeren Protons und dem konformationellen Verhältnis zwischen ${}^1\text{C}_4$ und ${}^4\text{C}_1$ wird über die Formel I aus Kapitel 3.1 hergeleitet. Eine Gegenüberstellung der Spektren des Fmoc-Bausteins mit dem entsprechenden Tetrapeptid und dessen Boronsäureester ist in Abbildung 36 anhand des ribopyranosylierten Cystein Bausteins **3** gezeigt.

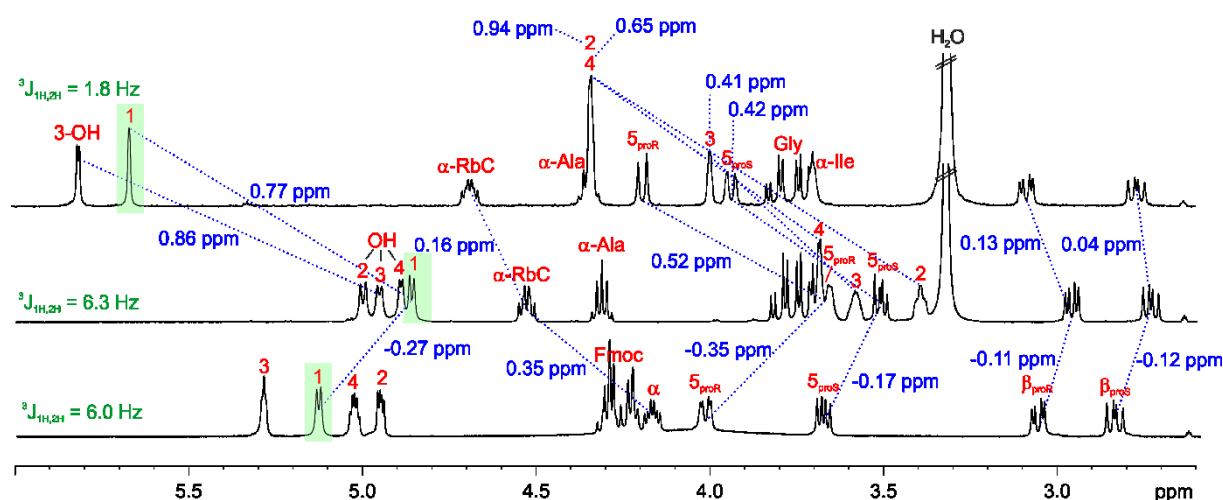


Abbildung 36. Ausschnitte aus den ${}^1\text{H}$ -NMR-Spektren (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6) des Fmoc-RbC(OAc) $_3$ -OH Bausteins **3** (unten), des entsprechenden Tetrapeptids **P3** (mitte) und des Boronsäure-gebundenen Tetrapeptids **P9** (oben). Die Verschiebungen der Signale sind in blau aufgeführt, die Signale in rot beschriftet und die Kopplungskonstante des anomeren Protons jeweils in grün angegeben.

Im Falle des ribopyranosylierten Cysteins (und des Penicillamins) wurde zunächst anhand des, in die „falsche“ Richtung verschobenen, Gleichgewichts, von einer verlangsamten Veresterungstendenz gegenüber den *O*-glykosylierten RAS ausgegangen. Das konformationelle Gleichgewicht zwischen ${}^1\text{C}_4$ und ${}^4\text{C}_1$ wurde zu 1:7 berechnet, wodurch der Veresterung stets eine Änderung der Konformation vorausgehen muss. In einem Konkurrenzexperiment zwischen dem RbC und dem RbS-Baustein enthaltenen Tetrapeptid (**P1** & **P3**) sollte untersucht werden, ob das weniger günstige Konformeren-Gleichgewicht des RbC-Bausteins in Bezug auf

die Veresterung einen Einfluss ausübt. Dafür wurden äquimolare Mengen der beiden RAS-Bausteine mit einem Äquivalent der Pyrenboronsäure im NMR-Röhrchen in $\text{DMSO}_{\text{d}6}$ vereint und über einen Zeitraum von 20 Stunden mehrfach NMR-spektroskopisch vermessen. Die Umsetzung der beiden Bausteine mit der Boronsäure verlief zeitlich derart ähnlich, dass von keinerlei Bevorzugung eines Bausteins und somit auch von keiner Beeinflussung durch das weniger bevorzugte, konformationelle Gleichgewicht des RbC-Bausteins ausgegangen werden konnte. Eine Auftragung der konkurrierenden Esterbildung der beiden Tetrapeptide in Abhängigkeit der Zeit ist in Abbildung 37 gezeigt.

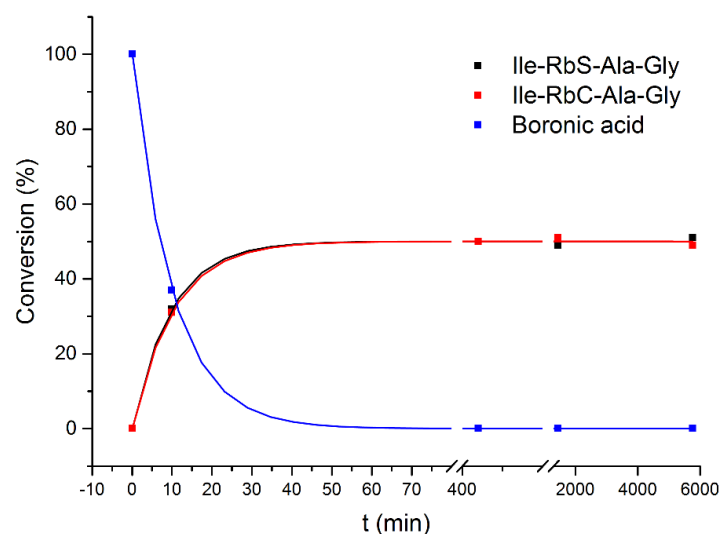


Abbildung 37. Konkurrenzexperiment zur Boronsäureveresterung der beiden Tetrapeptide mit den Bausteinen RbS **P1** bzw. RbC **P3** und der Pyrenboronsäure in $\text{DMSO}_{\text{d}6}$ im NMR-Maßstab. Die ^1H -NMR-Spektren wurden in den Abständen von 10 min, 7 Std., 1 Tag und 4 Tagen aufgenommen. Eine vollständige Umsetzung der Boronsäure konnte bereits nach 7 Std. festgestellt werden. Beide Tetrapeptide werden in etwa gleichermaßen gut gebunden.

Die nachfolgende Tabelle enthält eine Auflistung aller, mittels NMR-Spektroskopie erhaltener Werte für die Kopplungskonstante des anomeren Protons und die Verschiebungen für die jeweiligen Fmoc-RAS **1-7**, die entsprechenden Tetrapeptide **P1-P6** und dessen Boronsäureester **P7-P12**. Sofern möglich wurden auch die ^{13}C -Verschiebungen des anomeren Kohlenstoffs aufgeführt. Zusätzlich wurde das konformationelle Verhältnis zwischen $^1\text{C}_4$ und $^4\text{C}_1$ berechnet.

Tabelle 4. Auflistung der Kopplungskonstanten und der chemischen Verschiebung des anomeren Protons der Fmoc-RAS, der entsprechenden Tetrapeptide und dessen Boronsäureester. Zusätzlich ist das konformationelle Verhältnis der beiden Sessel-Konformationen aufgeführt.

| Zucker/ Fmoc- RAS | $^3J[\text{Hz}]$ \emptyset $^1\text{C}_4 / ^4\text{C}_1$ | $^1\text{C}_4 / ^4\text{C}_1$ [%] | 3J [Hz] TP | $^3J[\text{Hz}]$ TP + PB(OH) ₂ | δ_{H} [ppm] | δ_{H} [ppm] TP | δ_{H} [ppm] TP + PB(OH) ₂ | δ_{C} [ppm] | δ_{C} [ppm] TP |
|---|--|--------------------------------------|---------------------|---|------------------------------|------------------------------------|--|------------------------------|------------------------------------|
| Rib(OAc) ₄ | 4.4 | 63:37 | - | - | 5.88 | - | - | 90.5 | - |
| Rib(SAc) (OAc) ₃ 9 | 7.7 | 16:84 | - | - | 5.51 | - | - | 79.8 | - |
| RbS 1 | 2.8 | 88:12 | 3.9 | 1.8 | 4.82 | 4.62 | 4.88 | 97.3 | 98.6 |
| RbT 2 | 3.8 | 72:28 | 4.4 | 1.8 | 4.91 | 4.68 | 5.14 | 94.5 | 97.2 |
| RbC 3 | 6.0 | 40:60 | 6.3 | 1.8 | 5.13 | 4.86 | 5.66 | 80.6 | 83.6 |
| RbY 4 | 4.3 | 65:35 | 5.3 | 2.4 | 5.53 | 5.22 | 5.81 | 96.5 | 98.6 |
| RHp 5 | 4.4 | 63:37 | 4.8 | 2.2 | 4.98 | 4.68 | 5.25 | 97.2 | 99.5 |
| Rpa 6 | 4.3 | 65:35 | 5.5 | 1.9 | 5.29 | 5.08 | 5.77 | 80.0 | 81.9 |

Mithilfe der Tabelle konnten die erhaltenen Werte nochmals anschaulicher verglichen werden. So fällt auf, dass die Fmoc-RAS Bausteine durch den Einbau in die entsprechenden Tetrapeptide im ^1H -NMR-Spektrum für eine Hochfeld-Verschiebung sorgen, während dies im ^{13}C -NMR-Spektrum zu einer Tieffeld-Verschiebung führt. Die Veresterung der Tetrapeptide sorgt hingegen wieder zu einer Tieffeld-Verschiebung in den ^1H -NMR-Spektren. Bezogen auf die Kopplungskonstante des anomeren Protons führt der Einbau der Bausteine zwar durchgängig zu einer Vergrößerung des Werts (zwischen 0.3 und 1.2 Hz), dies wird jedoch eher auf den höheren sterischen Anspruch des Peptidrückgrads geschoben und eine damit verbundene Deformation des Sessels. Die Veresterung hingegen sorgt, wie bereits erwähnt, für die Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts in Richtung der $^1\text{C}_4$ -Konformation, da das darin vorliegende 1,3-diaxiale Diol Motiv von der Boronsäure gebunden wird. Eine niedrige Kopplungskonstante (≥ 2.4 Hz) kann also als Indikator für eine vollständige und stabile Esterbildung dienen.

Eine weitere Versuchsreihe zur Untersuchung der Stabilität der verschiedenen RAS Bausteine wurde anhand von UV/Vis Spektroskopie angefertigt. Zum einen wurden die RAS Bausteine

RbT **2**, RbC **3**, RbY **4** und Rpa **6** in Form ihrer, mit Pyrenboronsäure veresterten Tetrapeptide gegenüber dem Pyrenboronsäure-Komplex mit Ribose gemessen. Zum anderen erfolgte eine Messung der veresterten Tetrapeptide gegenüber dem Diol-Farbstoff Alizarin Rot S (ARS), um gegebenenfalls eine Eingliederung der Affinität der RAS gegenüber ARS vornehmen zu können. Die Proben für die UV/Vis Spektroskopie wurden aus den entsprechenden NMR-Röhrchen entnommen, mit DMSO aufgefüllt und in verschiedenen Konzentrationen mit ARS versetzt und vermessen. Die Ergebnisse der UV/Vis Titrationen sind in Abbildung 38 abgebildet.

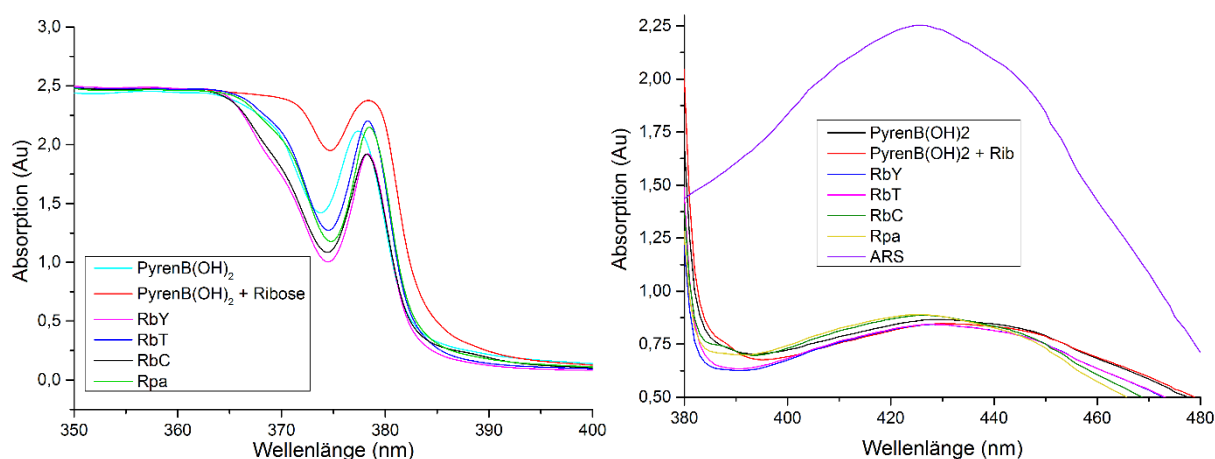


Abbildung 38. UV/Vis-Spektroskopie zum Vergleich der Bindungsstärken der verschiedenen RAS gegenüber Ribose. Links ist der Wellenlängenbereich von 350 - 400 nm gezeigt und das Maximum der gebundenen Dirole liegt jeweils bei einer Wellenlänge von 378 nm, weshalb von einer großen Bindungsstärke ausgegangen wird. Die Titration im rechten Spektrum wurde unter ARS-Zugabe durchgeführt, um die Bindungsstärke gegenüber ARS zu testen. Die violette, oberste Kurve stellt das ungebundene ARS, mit einem Maximum bei 425 nm dar. Die beiden Kurven für ARS + Pyrenboronsäure und ARS + Pyrenboronsäure + Ribose weisen ein Maximum bei 430 nm auf, was der Wellenlänge des gebundenen ARS entspricht. Das Maximum der beiden RAS RbY und RbT liegt ebenfalls in diesem Bereich, weshalb hier von einem Austausch der RAS gegen den Farbstoff ausgegangen wird. Dagegen kommt es zu keiner Veränderung der Maxima bei den S-verknüpften RAS RbC und Rpa, weshalb von einer höheren Bindungsstärke dieser beiden RAS zur Boronsäure ausgegangen wird.

Aus dem linken UV/Vis Spektrum geht hervor, dass die verschiedenen RAS das gleiche Absorptionsmaximum gegenüber Pyrenboronsäure aufweisen, wie Ribose. Dieses Ergebnis wird dahingehend interpretiert, dass bei allen getesteten Diolen eine starke Bindungsaffinität vorliegt. Das rechte UV/Vis Spektrum stellt die Konkurrenzreaktion der RAS gegen ARS dar und es zeigt sich, dass die Verschiebung des Maximums vom ungebundenen ARS (425 nm) zum gebundenen ARS (430 nm) nur bei den beiden RAS RbT **2** und RbY **4** stattfindet. Bei den beiden S-verknüpften RAS RbC **3** und Rpa **6** dagegen liegt das Maximum weiterhin bei 425 nm,

sodass offenbar kein Austausch gegen ARS auftritt und somit die größere Affinität bei RbC und Rpa gegenüber der Boronsäure vorhanden ist. Auch die Erhöhung der ARS-Konzentration führte zu keiner Verschiebung des Maximums. Die Aussagekraft dieser Methode ist jedoch mit Vorsicht zu genießen, da selbst kleinste pH-Schwankungen und Konzentrationsänderungen bereits einen Einfluss auf die UV/Vis Spektren haben können.

3.1.3 Peptide mit mehreren RAS zur Boronsäureveresterung

Im Zuge des Einbaus der synthetisierten RAS in Peptide wurden auch solche Peptide hergestellt, die mehrere RAS in spezieller Abfolge enthielten. Zunächst wurden drei verschiedene Peptide mit jeweils zwei, drei und vier RbS-Bausteinen **1** in der Sequenz synthetisiert. Dabei enthielt das Tetrapeptid die beiden RbS-Bausteine aufeinanderfolgend gegenüberliegend **P13**, das Heptapeptid drei parallel angeordnete RbS-Bausteine **P14**, alternierend mit natürlichen Aminosäuren und das Hexapeptid vier aufeinanderfolgende RbS-Bausteine **P15** (Abbildung 39).

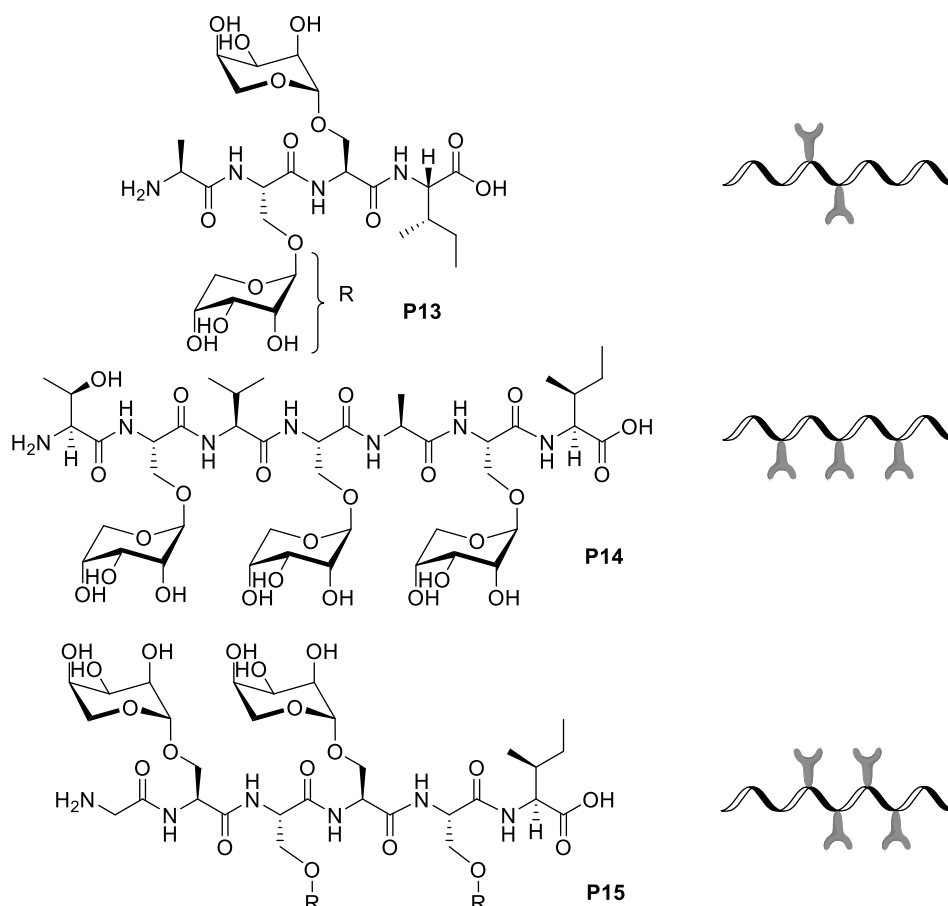


Abbildung 39. Darstellung der verschiedenen Peptide mit mehreren RAS Bausteinen in der Seitenkette. Rechts ist die graphische Darstellung der möglichen geometrischen Anordnungen der Veresterung mit Boronsäuren abgebildet.

Nach der RbS-Veresterung mit verschiedenen Boronsäuren wie Phenyldiboronsäure, Formylphenylboronsäure oder Carboxyphenylboronsäure wäre es über die jeweilige zweite funktionelle Gruppe der Boronsäure möglich, weitere Peptide parallel bzw. alternierend anzuknüpfen. Jedoch wurde auf eine andere Boronsäure zurückgegriffen, welche bereits in den vorherigen Kapiteln zur Veresterung der RAS Bausteine diente und aufgrund der chromophoren Eigenschaften an dieser Stelle als besonders interessant eingestuft wurde. Daher wurde Pyrenboronsäure in den entsprechenden Äquivalenten zum jeweiligen Peptid gegeben und in NMR-Experimenten in DMSO_{d6} vermessen (Abb. 40, 41, 42).

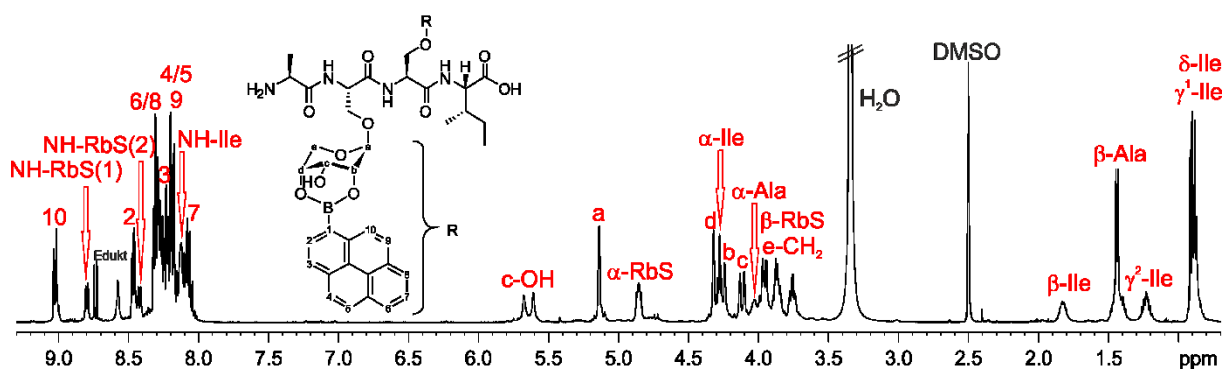


Abbildung 40. ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K, DMSO_{d6}) der Titration des Tetrapeptids **P13** mit 2 Äquivalenten Pyrenboronsäure (**P16**).

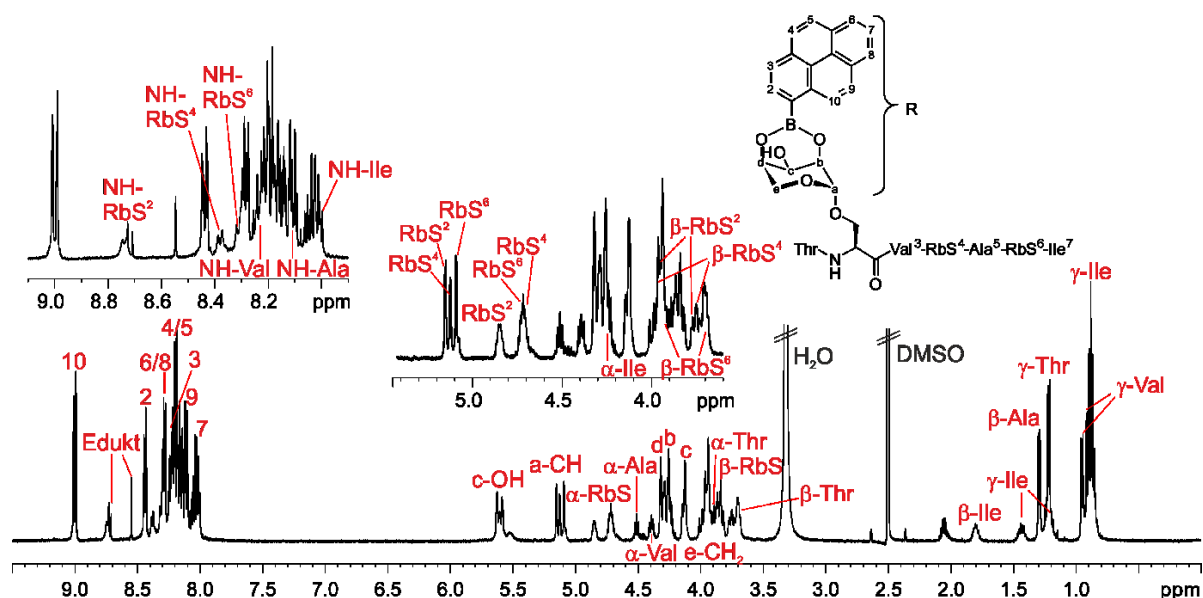


Abbildung 41. ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K, DMSO_{d6}) der Titration des Heptapeptids **P14** mit 3 Äquivalenten Pyrenboronsäure (**P17**).

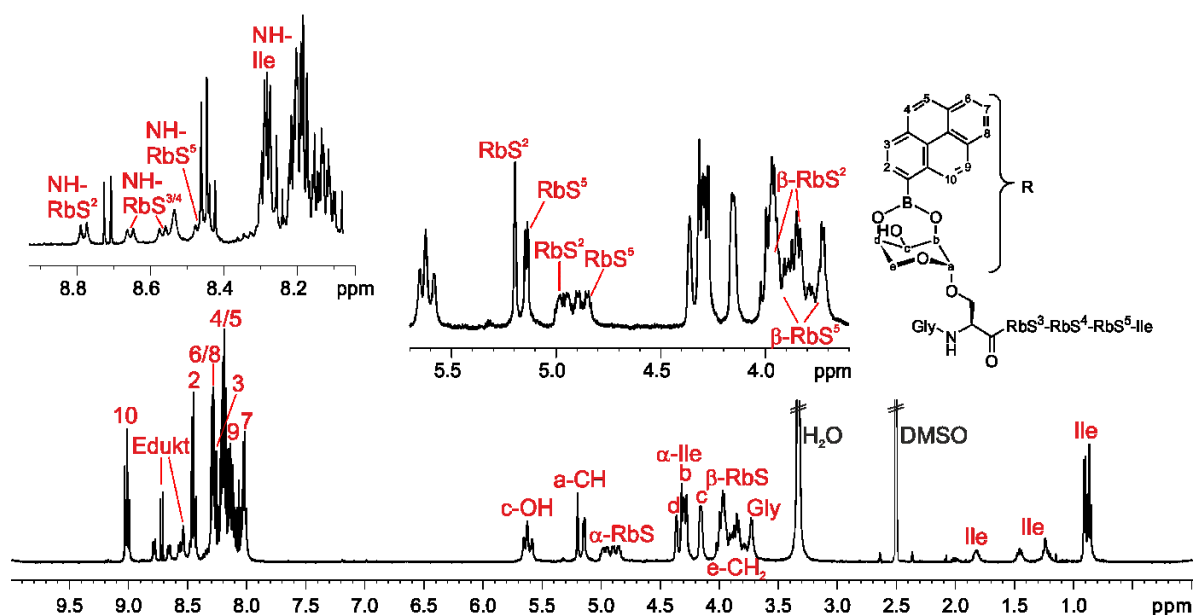


Abbildung 42. ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6) der Titration des Hexapeptids **P15** mit 4 Äquivalenten Pyrenboronsäure (**P18**).

In allen gezeigten Spektren kann von einer vollständigen Veresterung der RbS-Bausteine mit Pyrenboronsäure ausgegangen werden, da sowohl der charakteristische Shift des anomeren Protons (ca. 4.62 ppm auf 5.12 ppm - durchschnittlicher Wert aus den Spektren des Heptapeptids **P14**), als auch die Änderung der Kopplungskonstante von ca. 4 Hz auf 2 Hz beobachtet werden kann. Zusätzlich tritt in allen Spektren die erwartete Tieffeldverschiebung des 3-OH Signals und der 2,3,4-CH Signale (in den Spektren benannt nach: c-OH, b,c,d-CH) auf, sowie das Verschwinden der Signale der 2- und 4-OH Gruppen. Teilweise ist eine genaue Zuordnung der einzelnen RbS-Bausteine im ^1H -NMR-Spektrum der Peptide mittels 2D-Spektren möglich. Sofern dies möglich war, sind die Signale in den Spektren nach der Position des RbS-Bausteins im Peptid nummeriert.

Darüber hinaus wurden UV/Vis Spektren aufgenommen, um nach möglichen Effekten wie π -stacking oder Excimer Emission zu schauen (Abbildung 43/44).

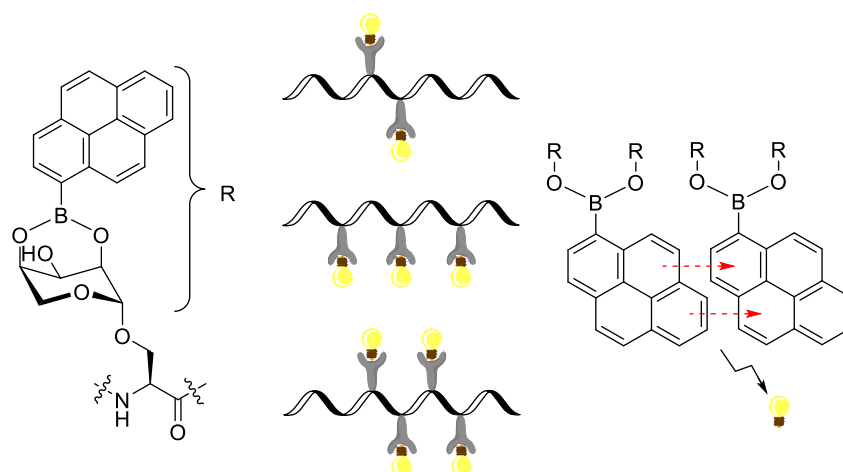


Abbildung 43. Führt eine unterschiedliche Geometrie in der Anordnung der RAS-Bausteine im Peptid *backbone* zu verschiedenen Absorptions-Werten im UV-Vis?

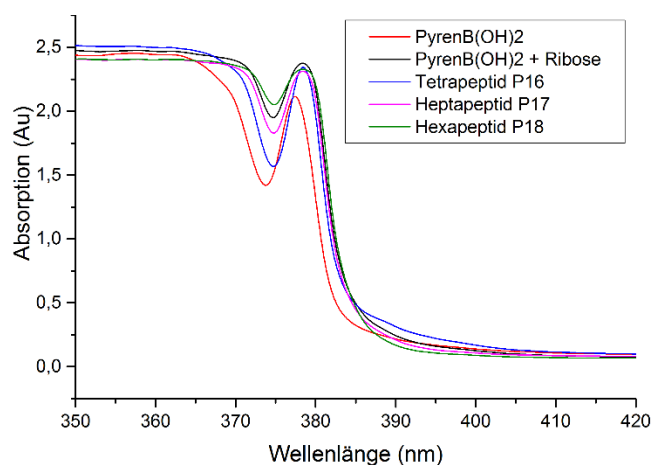


Abbildung 44. UV/Vis-Spektroskopie der RbS-enthaltenden Peptide. Das Absorptionsmaximum der freien Pyrenboronsäure liegt bei 376 nm. Da sich die Absorptionsmaxima aller RbS-enthaltenden Peptide nicht voneinander unterscheiden (379 nm), wird nicht von den erhofften Effekten wie π -stacking oder Excimer Emission ausgegangen.

Sowohl die aufgenommenen UV/Vis Spektren, als auch die visuell mittels der UV-Lampe empfundene Farbwahrnehmung (keine unterschiedliche Fluoreszenz), deuten darauf hin, dass keine Effekte wie π -stacking oder Excimer Emission durch das Einbringen mehrerer Pyrenboronsäuren in paralleler oder alternierender Anordnung hervorgerufen werden konnten. Daher wäre es denkbar über weitere Veränderungen des Peptidrückgrats den Abstand der Chromophore zueinander zu verändern.

3.1.4 Titration der ribopyranosylierten Tetrapeptide mit 1,4-Phenyldiboronsäure

Neben Pyrenboronsäure, welche unter dem Gesichtspunkt der potentiellen Fluoreszenz-Einführung verwendet wurde, wurden auch Titrationsreihen mit 1,4-Phenyldiboronsäure durchgeführt. Diese verfügt über zwei Bindungsstellen, die sich zueinander in *para*-Position befinden, sodass entsprechend zwei Zucker gleichzeitig gebunden werden können. Mit diesem Hintergrund war zu überlegen, ob eine gezielte Anordnung verschiedener (oder gleicher), peptidischer Reste durch die beidseitige Veresterung möglich wäre. Somit würde die Phenyldiboronsäure eine Spacer-Funktion zwischen den peptidischen Resten einnehmen und möglicherweise in der Lage sein, eine parallele Anordnung dieser einzuleiten. Zunächst wurde für einen solchen Ansatz ein kurzes Peptid gewählt, um die generelle Verfolgbarkeit der Umsetzung einschätzen zu können. Je nach Faltungstendenz und sterischem Anspruch der potentiell verwendbaren, größeren Peptide, könnte auch dies die Umsetzung beider Boronsäuren mit je einem RAS enthaltenden Peptid pro Seite beeinflussen. Zu Testzwecken wurde deshalb das Tetrapeptid **P1** (Ile-RbS-Ala-Gly) aus den vorangegangenen Experimenten eingesetzt. Die Titration wurde in Schritten á 0.25 eq bis zu einem Äquivalent durchgeführt und anschließend zwei weitere Schritte auf 1.50 eq und 2.00 eq vollzogen. Vor der NMR-spektroskopischen Messung wurde jeweils eine Stunde gewartet, um das Einstellen des Gleichgewichts zu gewährleisten. Die Umsetzung wurde speziell im aromatischen Bereich beobachtet, da dort die OH-Protonen der Boronsäure zu finden waren und anhand dieser die drei möglichen Spezies der Umsetzung unterschieden werden konnten. Die freie Phenyldiboronsäure konnte anhand des Signals bei 7.97 ppm detektiert werden, während die einfach veresterte Boronsäure ein Signal bei 8.03 ppm aufwies. Bei vollständiger Veresterung wären beide Signale verschwunden, was jedoch zu keinem Zeitpunkt der Titration gänzlich erreicht werden konnte. Da die Ansätze jedoch erneut im NMR-Maßstab durchgeführt wurden, kann eine Fehlerquelle bei der Einwaage der geringen Mengen nicht ausgeschlossen werden. Tendenziell ist aber von einer langsameren „Zweit-Veresterung“ auszugehen, da das Spektrum nach Zugabe von zwei Äquivalenten Boronsäure erst nach einem Tag eine fast vollständige Umsetzung zeigte und nach einer Stunde noch deutlich größere Mengen der einfach-veresterten Boronsäure enthielt. Eine Auftragung der ¹H-NMR-Spektren ist in Abbildung 45 gezeigt.

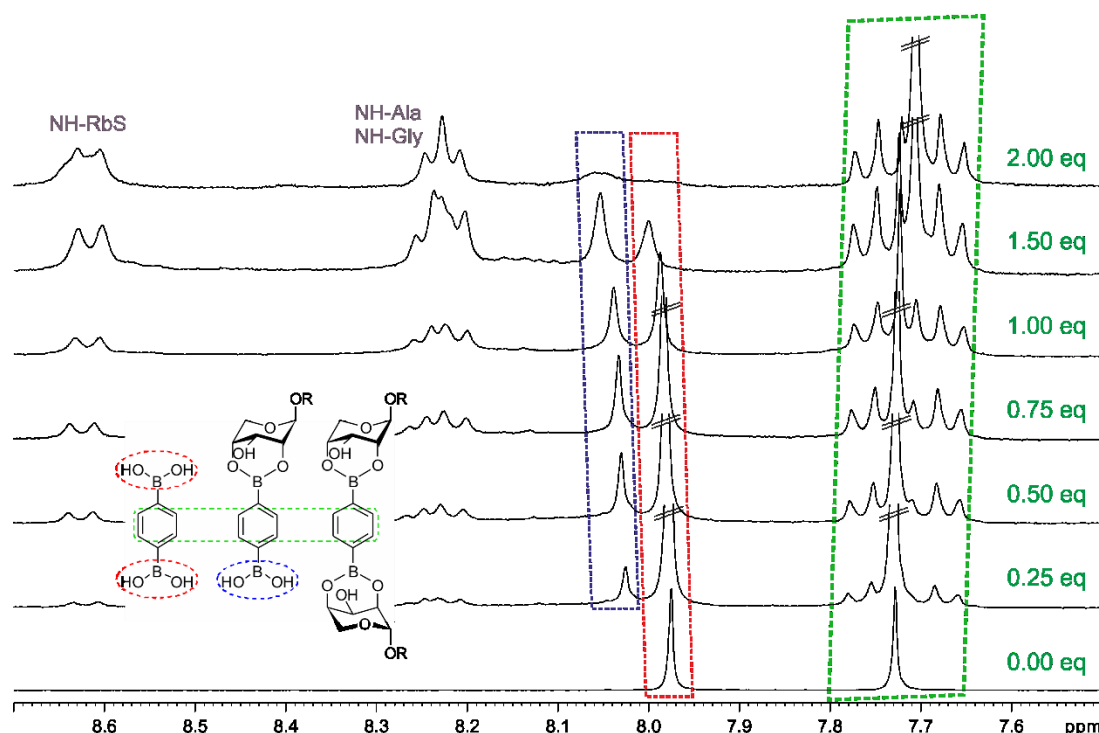


Abbildung 45. Übersicht der ^1H -NMR-Spektren (300 MHz, 300 K, DMSO-d_6) der Titration des Tetrapeptids **P1** mit 1,4-Phenyldiboronsäure. Die farbig markierten Signale sind entsprechend der links abgebildeten Strukturen koloriert. Mit Zunahme der Boronsäuremenge verkleinert sich das OH-Signal der beidseitig freien Boronsäure und ein zweiter Signalsatz taucht auf, welcher der einfach veresterten Spezies (Mitte) zuzuordnen ist. Dieses Signal (blau) verkleinert sich anschließend wieder, da auch die zweite Boronsäure verestert wird. Aufgrund der unvollständigen Veresterung verschwindet dieses Signal jedoch nicht gänzlich nach Zugabe von 2 Äquivalenten Boronsäure.

Mit Hilfe von 2D-Spektren konnte außerdem die stattfindende Veresterung verifiziert werden. Abbildung 46 zeigt einen Ausschnitt aus dem ROESY Spektrum.

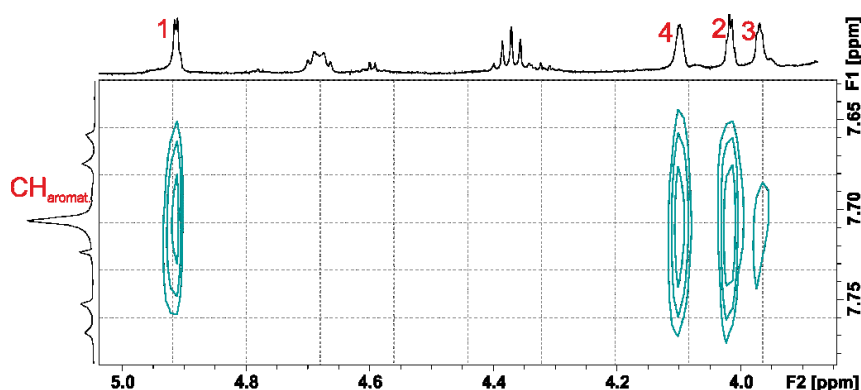


Abbildung 46. Ausschnitt aus dem ROESY Spektrum (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6) der Titration des Tetrapeptids **P1** mit 2 eq 1,4-Phenyldiboronsäure. Die Kopplung der aromatischen Protonen zu den Zucker-Protonen weist auf die erfolgreiche Veresterung hin.

In diesem Spektrum sind sehr deutlich die NOE-Kontakte zwischen den aromatischen Protonen der Phenylldiboronsäure und den 1-, 2-, 3- und 4-CH Protonen des Ribopyranosyl-Rests im Tetrapeptid zu erkennen. Die Kopplung zu den äquatorialen Protonen ist stärker zu sehen, als die des axial stehenden 3-CH Protons, da dieses im Sessel nicht in Richtung des Aromaten orientiert ist.

Im Folgenden wurde das gleiche Experiment mit einem etwas längeren Peptid, einem Dekapeptid **P19** (TTYADFIARbSG), durchgeführt. Ein Vergleich der beiden Edukt-Spektren mit dem erhaltenen Produkt-Spektrum ist in Abbildung 47 gezeigt.

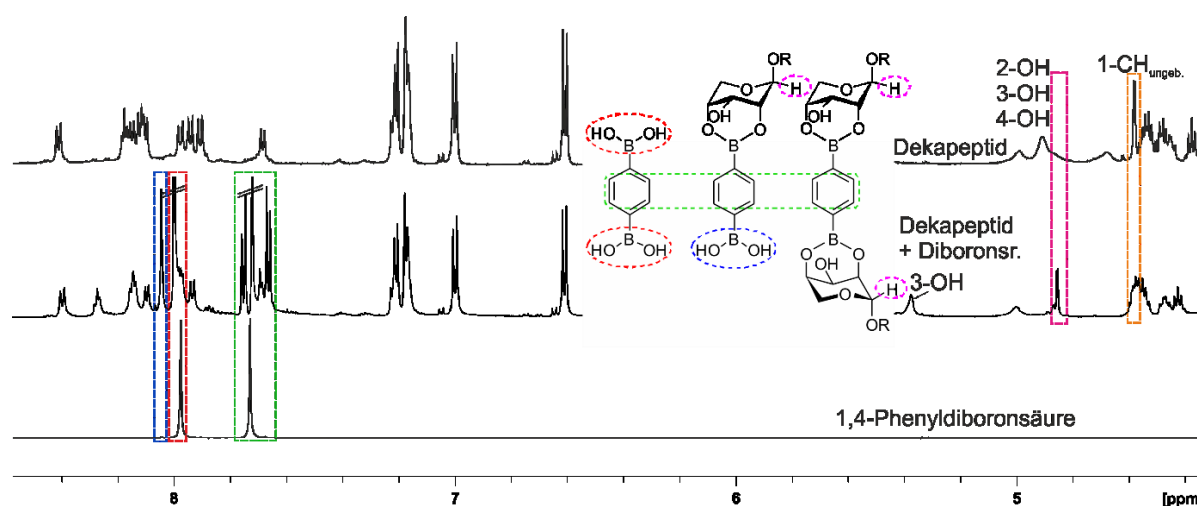


Abbildung 47. Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (300 MHz, 300 K, DMSO-d_6) der Titration des Dekapeptids **P19** mit 1,4-Phenylldiboronsäure. Die farbige markierten Signale sind entsprechend der mittig abgebildeten Strukturen koloriert. Die Veresterung des Dekapeptids erfolgt quantitativ, da der 1-CH-Peak des ungebundenen Zuckers im mittleren Produkt-Spektrum vollständig verschwunden ist (orange). Außerdem tritt die charakteristische Tieffeldverschiebung des 3-OH Signals im Zuge der Veresterung auf. Auch kommt es zu einer Verbreiterung des Signals der aromatischen Protonen der Boronsäure, da die Symmetrie durch die Veresterung gebrochen wird.

In der gezeigten Versuchsreihe sollte das Prinzip der Kooperativität untersucht werden, welches speziell aus der supramolekularen Chemie bekannt ist. Das Auftreten zweier Fälle im Zuge der Veresterung mit der Diboronsäure wäre denkbar. Zum einen können repulsive Wechselwirkungen (negative Kooperativität) zwischen den Peptiden auftreten, wenn die Veresterung nicht auf beiden Seiten der Boronsäure stattfindet, sondern die Bildung des Monoesters bevorzugt wird. Zum anderen sind attraktive Wechselwirkungen (positive Kooperativität) zwischen den Peptiden denkbar, was dazu führen würde, dass sich der Diester unter dem Energiegewinn der Wechselwirkung bildet und möglicherweise sogar eine NMR-technisch verfolgbare Monoester Bildung ausgelassen wird.

Die erhaltenen Ergebnisse aus den ^1H -NMR-Spektren deuten in beiden Fällen darauf hin, dass es zunächst überwiegend zur Bildung des Monoesters kommt und erst nach und nach die zweite,

freie Boronsäure gebunden wird. Darüber hinaus ist durchgängig ein Signal für die beidseitig ungebundene Boronsäure in den Spektren vorhanden, sodass es zu keinem Zeitpunkt zu einer vollständigen Veresterung zum Diester kommt, obwohl zunächst mit einem Unterschuss an Boronsäure titriert wurde. Somit ist davon auszugehen, dass repulsive Wechselwirkungen zwischen den Peptiden überwiegen oder eine generell verringerte Veresterungstendenz mit 1,4-Phenyldiboronsäure vorliegt.

3.1.5 Titrationen der ribopyranosylierten Tetrapeptide mit trivalenten Metallen

Wie zuvor bereits erwähnt, bietet das *ax-äq-ax*-Motiv der Ribopyranose verschiedene Möglichkeiten der Komplexierung. Im Kapitel zuvor wurden die neutralen Komplexe, die aus der Veresterung mit Boronsäuren hervorgehen können, vorgestellt, während in diesem Kapitel die kationischen Komplexe, die durch Zugabe von Metallsalzen entstehen, behandelt werden. Nachdem in der vorangegangenen Masterarbeit bereits eine Metallkomplexierungs-Titration im NMR-Maßstab mit einem divalenten Metall, Calciumchlorid, durchgeführt wurde, bei welcher nach Zugabe von 3.00 eq CaCl_2 eine vollständige Komplexierung des Tetrapeptids anhand der abgelesenen Kopplungskonstante detektiert werden konnte, wurden im Zuge dieser Arbeit Versuche mit trivalenten Metallen angestellt.^[259,260] Dafür wurden verschiedene Metalle getestet, jedoch mussten einige Titration aufgrund von Löslichkeitsproblemen abgebrochen werden. Mit Yttrium- und Lanthanchlorid konnten jedoch die erwarteten Ergebnisse erhalten werden, sodass diese im Folgenden anhand der gemessenen ^1H -NMR-Spektren erläutert werden sollen (Abbildung 48 und 49). Als Testpeptid diente weiterhin das Tetrapeptid **P1** aus Ile-RbS-Ala-Gly und als Lösungsmittel wurden 0.6 mL $\text{Methanol}_{\text{d}4}$ verwendet, da die Metallsalze darin die beste Löslichkeit aufwiesen.

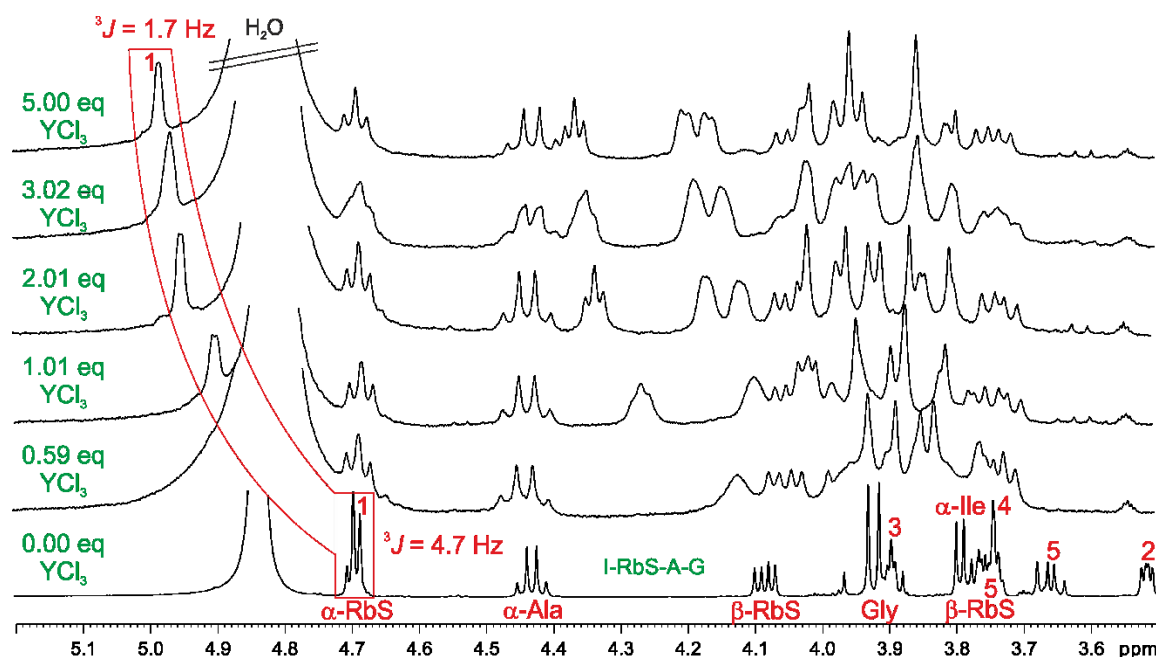


Abbildung 48. Übersicht der ^1H -NMR-Spektren (300 MHz, 300 K, $\text{MeOH}_{\text{d}4}$) der Titration des Tetrapeptids **P1** mit YCl_3 . Im unteren Spektrum (500 MHz, 300 K, $\text{MeOH}_{\text{d}4}$) ist zum Vergleich das Tetrapeptid **P1** aufgeführt. Das anomere Proton ist rot markiert.

Die NMR-Versuche wurden von Timo Zimmer unter Anleitung in seiner Bachelorarbeit durchgeführt.^[261] Bei der Titration des Tetrapeptids **P1** mit YCl_3 wurde das Salz in Mengen von 0.59, 1.01, 2.01, 3.02 und 5.00 Äquivalenten zugegeben und kurze Zeit später NMR-spektroskopisch vermessen. Die Einwaage der Metallsalz-Hydrate gestaltete sich teilweise als etwas problematisch, da zum einen die abzuwiegenden Mengen sehr gering waren und zum anderen die hygroskopischen Eigenschaften der Salze zu Ungenauigkeiten führten. Das Hauptaugenmerk bei den erhaltenen Spektren lag erneut auf dem Signal des anomeren Protons des ribopyranosylierten Bausteins, weil, wie zuvor bei der Boronsäureveresterung, von einer Tieffeld-Verschiebung und einer Verkleinerung der Kopplungskonstante des Signals ausgegangen wurde. Da die Metalle ebenfalls die $^1\text{C}_4$ -Konformation des Zuckers bevorzugt binden sollten, waren die gleichen Beobachtungen zu erwarten, wie im Kapitel zuvor. Das anomere Proton kann in beiden Abbildungen durch die rote Umrandung verfolgt werden. Es ist sowohl eine Tieffeld-Verschiebung um 0.29 ppm bei der Titration mit YCl_3 nach Zugabe von 5.00 Äquivalenten (0.26 ppm bei 5.00 eq LaCl_3) zu beobachten, als auch eine Verkleinerung der Kopplungskonstante von 4.7 auf 1.7 Hz ($^3J_{\text{H},2\text{H}} = 1.6 \text{ Hz}$ bei LaCl_3), was die Vermutungen bestätigte.

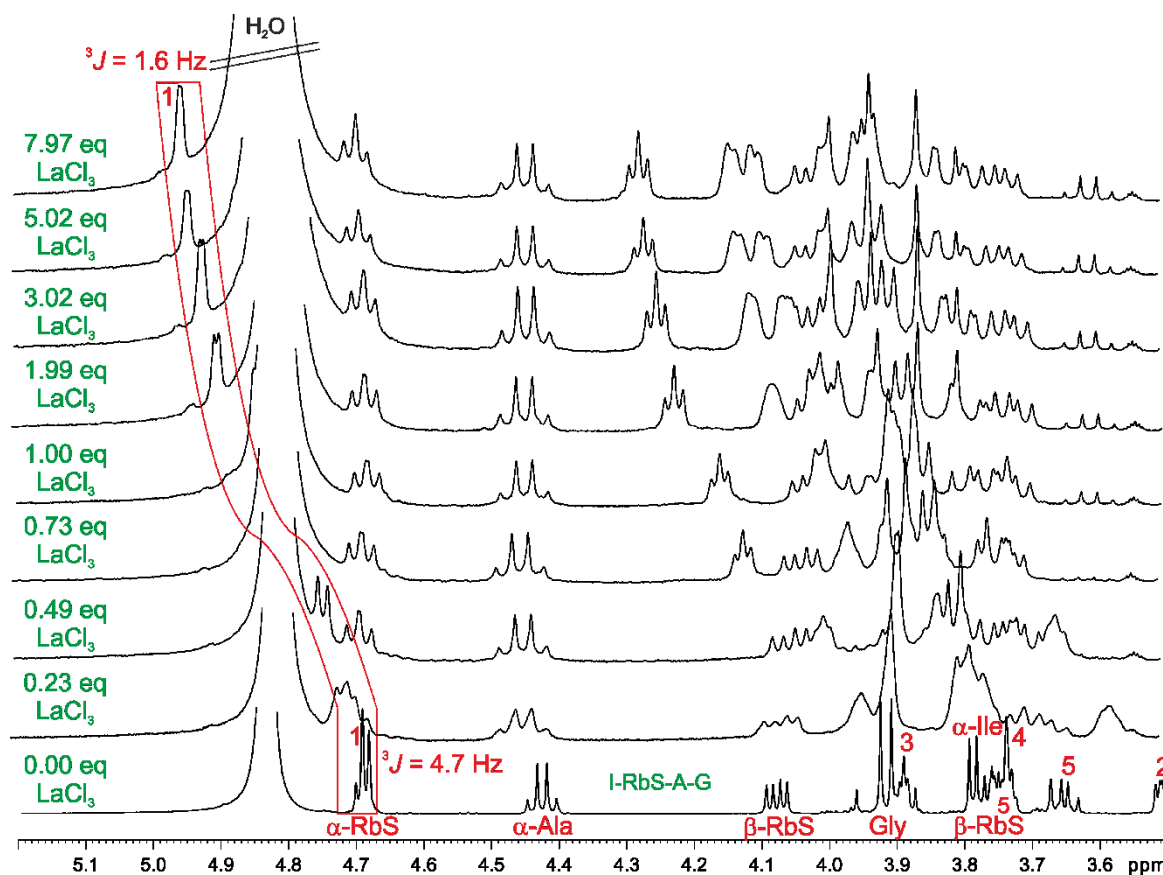


Abbildung 49. Übersicht der ^1H -NMR-Spektren (300 MHz, 300 K, $\text{MeOH}_{\text{d}4}$) der Titration des Tetrapeptids **P1** mit LaCl_3 . Im unteren Spektrum (500 MHz, 300 K, $\text{MeOH}_{\text{d}4}$) ist zum Vergleich das Tetrapeptid **P1** aufgeführt. Das anomere Proton ist rot markiert.

Eine graphische Auftragung der chemischen Verschiebung δ bzw. der Kopplungskonstante gegen die enthaltene Metallsalzmenge als Vergleich zwischen beiden Komplexen ist in Abbildung 50 dargestellt.

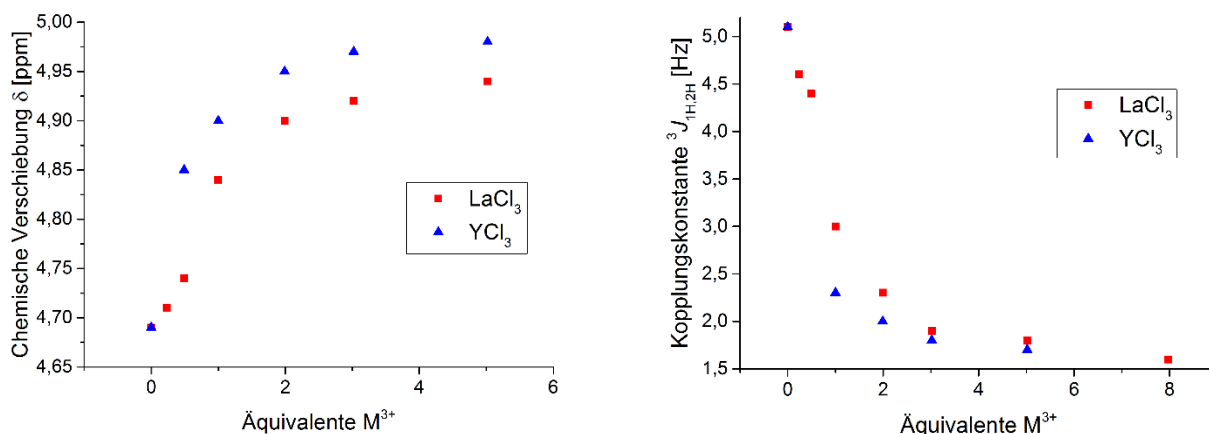


Abbildung 50. Graphische Auftragung der chemischen Verschiebung δ gegen die Äquivalente des jeweiligen Metallsalzes (links) bzw. der Kopplungskonstante $^3J_{1\text{H},2\text{H}}$ gegen die Äquivalente (rechts). Bei beiden Auftragungen und Metallsalzen verläuft die Kurve in einen Sättigungsbereich, welcher ab einer Menge von 3,00 Äquivalenten eintritt.

Beide Metallsalze können anhand der Ergebnisse als gute Komplexbildner mit der im Tetrapeptid **P1** enthaltenen Ribopyranose beschrieben werden. Eine vollständige Komplexierung des Tetrapeptids **P1** ist nach Zugabe von etwa 5.00 Äquivalenten des jeweiligen Metallsalzes erreicht, was die erhaltenen Kopplungskonstanten von 1.6 bzw. 1.7 Hz bestätigten. Nach Zugabe von 3.00 Äquivalenten Metallsalz tritt nur noch eine langsame Änderung beider beobachteter Werte auf, sodass von einer Absättigung ausgegangen werden konnte. Die Berechnung einer Gleichgewichtskonstante gestaltete sich durch die großen Mengen an enthaltenem Kristallwasser als äußerst schwierig, konnte aber in einer ungefähren Größenordnung von 10^{-6} - 10^{-8} abgeschätzt werden. Dieses Ergebnis spricht für eine sehr langsame Komplexierung des Zuckers mit dem jeweiligen Metallsalz, was jedoch mit den benötigten Mengen von 5 Äquivalenten für eine vollständige Umsetzung konform geht. Insgesamt deuten die Werte außerdem darauf hin, dass die Komplexierung mit YCl_3 einen minimal stabileren Komplex liefert und schneller gebildet wird als mit LaCl_3 , jedoch könnte dies auch mit der ungenauen Einwaage der Metallsalze im Zusammenhang stehen.

3.1.6 Berechnung der Gleichgewichtskonstante der Veresterung zwischen Pyrenboronsäure und dem Tetrapeptid I-RbS-A-G in DMSO_{d6}

Auch die Bestimmung der Gleichgewichtskonstante konnte, basierend auf einer konzentrationsabhängigen Titrationsreihe, erfolgen. Dass es sich bei der Boronsäureveresterung um eine reversible kovalente Bindungsbildung handelt, bringt den Vorteil mit sich, dass dies durch einen langsamen chemischen Austausch NMR-technisch verfolgt werden kann. Somit kann jede gebildete Spezies im ^1H -NMR-Spektrum voneinander unterschieden und sogar das vorliegende Verhältnis der Spezies untereinander durch dessen Integrale bestimmt werden. Letzteres ist möglich, da es sich bei der NMR-Spektroskopie um eine quantitative Methode handelt, wodurch sogar die Konzentrationen der einzelnen Spezies in Lösung aus den Integralen berechnet werden können. Im Gegensatz dazu liegt bei nicht-kovalenten bzw. ionischen Wechselwirkungen zumeist ein schneller chemischer Austausch vor, wodurch nur die gemittelten Signale des Reaktionsverlaufs erhalten werden und keine Bestimmung der Zwischenstufen möglich ist. Ein Vergleich beider Fälle ist in Abbildung 51 dargestellt.^[262,263]

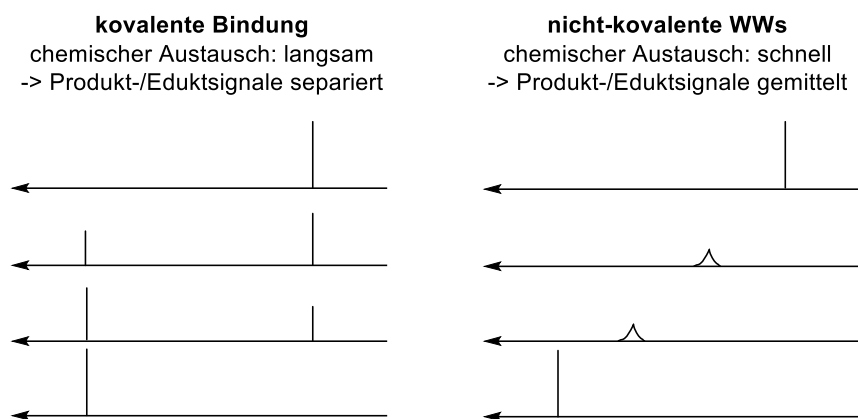


Abbildung 51. Gegenüberstellung der vereinfachten NMR-Strichspektren bei kovalenter Bindung (links) und nicht-kovalenten Wechselwirkungen (rechts). Kovalente Bindungen zeichnen sich durch den langsamen chemischen Austausch aus, sodass sowohl für die Edukte, als auch für die Produkte einzelne Signale abzulesen sind. Der Umsatz ist darüber hinaus aus den Integralen direkt ablesbar. Bei Verbindungen mit nicht-kovalenten WWs liegen die Signale im schnellen chemischen Austausch miteinander vor und liefern deshalb nur gemittelte Signale. Dadurch ist keine Bestimmung der enthaltenen Zwischenstufen oder eine Umsatzverfolgung möglich.^[262]

Trotz der guten Verfolgbarkeit des Umsatzes im ^1H -NMR-Spektrum reagiert das System sehr empfindlich auf Änderungen einiger Parameter. So hat die Wassermenge im NMR-Röhrchen während der Titration einen Einfluss auf das Veresterungsgleichgewicht, da große Wassermengen das Gleichgewicht auf die Seite der Edukte verschieben. Daher wird die Wassermenge auch bei der Berechnung der Gleichgewichtskonstante mit einbezogen. Auch der pH-Wert spielt eine entscheidende Rolle für die Veresterungstendenz, da die Reaktivität der Boronsäure sehr stark davon abhängt, welcher pH-Wert in Lösung vorliegt. Im Zuge dieser konzentrationsabhängigen Titrationsreihe wurde der Aspekt des pH-Werts jedoch als vernachlässigbar eingestuft, da mit sehr gering konzentrierten Lösungen gearbeitet wurde. Weitere Parameter, die einen Einfluss auf das Gleichgewicht üben, sind die Temperatur, die Konzentration der Edukte, das Lösungsmittel, die Struktur der RAS enthaltenen Peptide und das Substitutionsmuster der Boronsäure. Die Titrationsen wurden, wie bereits erwähnt, bei stark verdünnter Konzentration zwischen 1.00 und 20.0 mmol/L durchgeführt, sodass die Aktivität vernachlässigt und von einem System im Gleichgewicht ausgegangen wurde. Unter Verwendung des Massenwirkungsgesetzes (Formel II) konnte über die aus den NMR-Spektren erhaltenen Konzentrationen unter Berücksichtigung des Wassergehalts näherungsweise eine Gleichgewichtskonstante der Veresterung berechnet werden.

$$K = \frac{[\text{Ester}] \cdot [\text{H}_2\text{O}]^2}{[\text{Diol}] \cdot [\text{B}(\text{OH})_2]} \quad (\text{II})$$

Tabelle 5. Übersicht der Werte für die näherungsweise Berechnung der Gleichgewichtskonstante der Veresterung zwischen der Pyrenboronsäure und dem Tetrapeptid (I-RbS-A-G). Der Mittelwert der Gleichgewichtskonstante berechnet sich zu $K = 767$.

| Konzentration | Stoffmenge RB(OH) ₂ | Umsatz Diol | K |
|---------------|--------------------------------|-------------|------|
| [mmol/L] | [μmol] | [%] | |
| 1.00 | 0.70 | 15 | 416 |
| 5.00 | 3.50 | 38 | 529 |
| 10.0 | 7.00 | 53 | 809 |
| 20.0 | 14.0 | 80 | 1314 |

Die ¹H-NMR-Spektren wurden in einer Lösung aus 0.675 mL DMSO_{d6} und 25.0 μL H₂O aufgenommen, wobei bereits das DMSO_{d6} eine undefinierte Wassermenge enthielt. Über die Integration der Signale wurde der Umsatz, sowie die enthaltene Wassermenge bestimmt und schließlich mittels Massenwirkungsgesetz die Gleichgewichtskonstante berechnet. Der Mittelwert der Gleichgewichtskonstante ergab sich dabei zu 767, was für eine sehr schnelle und Produkt-gerichtete Reaktion spräche. Da die Umsetzung trotz der geringen Konzentration recht schnell voranschritt, wurde der erhaltene Wert für die Gleichgewichtskonstante als plausibel empfunden. Die Titration wurde noch zwei weitere Male wiederholt, wobei Werte der gleichen Größenordnung erhalten wurden.

3.1.7 Veresterung zwischen Benzoboroxol und dem Dekapeptid P19 in wässrigen Puffersystemen (pH = 7.5)

Die bisherigen Versuche beschränkten sich auf die Untersuchung der Veresterungstendenz in organischen Lösungsmitteln (DMSO_{d6} und MeOH_{d4}), da die Verfolgbarkeit der Umsetzung durch signifikante Signale im ¹H-NMR-Spektrum sehr gut gegeben war. Unter dem Gesichtspunkt einer potentiellen biomedizinischen Anwendbarkeit der kovalent reversiblen Verknüpfung einer Boronsäure mit ribopyranosylierten Peptiden muss jedoch auch die Aktivität zueinander unter physiologischen Bedingungen gegeben sein und somit untersucht werden. Aus diesem Grund sollten die bereits beschriebenen Experimente nun auch auf das wässrige Milieu übertragen und auf eine gegebenenfalls vergleichbare Affinität hin überprüft werden. Bekanntermaßen spielt bei solchen Experimenten in wässrigen Puffersystemen der pH-Wert eine entscheidende Rolle für die Aktivität der entsprechenden Boronsäure.^[127] Befindet

sich der pK_s -Wert der verwendeten Boronsäure weit oberhalb des pH-Werts der Pufferlösung, so ist deren Aktivität deutlich herabgesetzt (optimale Bedingungen bei $pH \geq pK_s$ der Boronsäure).^[264] Unter Berücksichtigung, dass der für die Veresterung verwendete Puffer möglichst nah am physiologischen pH-Wert liegen sollte, kann eine Verwendung der Phenylboronsäure für diese Art von Experimenten ausgeschlossen werden, da ihre Reaktivität durch den pK_s -Wert von 8.8 für einen sehr geringe Umsatz sorgen würde. Laut Literatur kommen Boronsäuren des sogenannten WULFF-Typs, sowie Benzoboroxole besonders in Frage für Veresterungen bei physiologischem pH-Wert, da deren pK_s -Werte im Bereich um 7.2-7.4 liegen und somit in lediglich leicht basischem Milieu gearbeitet werden kann.^[133,264] Die beiden letztgenannten Boronsäure-Formen wurden bereits in Kapitel 1.3 vorgestellt und werden in den folgenden Kapiteln für Veresterungsversuche im wässrigen Milieu verwendet. Zunächst wurden Untersuchungen mit Benzoboroxol angestellt, wofür ein 50 mM Kaliumphosphat-Puffer mit $pH = 7.5$ hergestellt wurde. Äquimolare Mengen des Dekapeptids **P19** (TTYADFIAR**b**SG) und des Benzoboroxols wurden eingewogen, in 0.6 mL Kaliumphosphatpuffer/D₂O im Verhältnis 9:1 gelöst und anschließend NMR-spektroskopisch vermessen. Die Verfolgbarkeit des Umsatzes erwies sich jedoch im Vergleich zu den in DMSO_{d6} aufgenommenen Spektren deutlich schwieriger. Zwar konnte eine Hochfeld-Verschiebung aller Benzoboroxol-Signale und die Verschiebung einiger weniger Signale des Dekapeptids verzeichnet werden, allerdings konnte weder die als charakteristisch für die Veresterung deklarierte Änderung der Kopplungskonstante des anomeren Protons noch eine Tieffeld-Verschiebung des Signals beobachtet werden, da das Signal durch die Wasserunterdrückung bei der Messung nicht mehr sichtbar war.

Aus diesem Grund wurde auf eine andere Methode zurückgegriffen, um eine Bindung nachzuweisen bzw. sie bestenfalls zusätzlich mit einer Gleichgewichtskonstante quantifizieren zu können. Mittels UV/Vis Spektroskopie sollte nach der Methode von WANG *et al.*, bei welcher der Farbstoff Alizarin Rot S (ARS) mit dem Boroxol gegen ein weiteres Diol titriert wird, über die Änderung des Absorptionsmaximums (und die Farbreaktion) die Verdrängung des ARS von einem potentiell stärker bindenden Diol beobachtet werden (Abb. 52).^[159,160] Bei diesem Konkurrenzexperiment wird der Umstand ausgenutzt, dass sich das Absorptionsmaximum des freien ARS im Zuge der Veresterung mit Boroxol zu einer niedrigeren Wellenlänge verschiebt. Dies kann durch Zugabe eines Diols mit höherer Affinität im Vergleich zu ARS wieder umgekehrt werden, sodass das Absorptionsmaximum wieder bei einer höheren Wellenlänge detektiert wird (freies ARS).

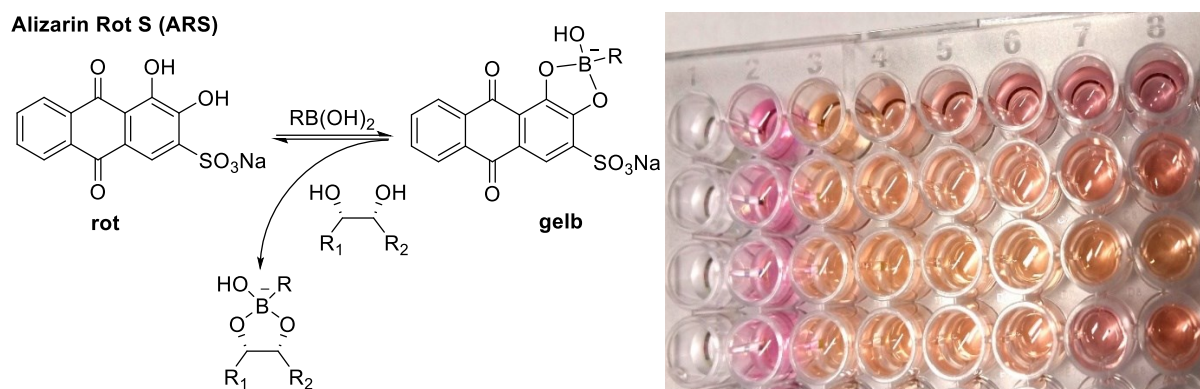


Abbildung 52. Links ist die Farbreaktion des freien ARS (rot) mit einer Boronsäure gezeigt. Der entstehende Ester wird durch die gelbe Farbe der Lösung und ein niedrigeres Absorptionsmaximum detektiert. Durch Zugabe eines weiteren Diols mit höherer Affinität im Vergleich zum ARS wird dieses wieder freigesetzt, sodass die Lösung erneut rot wird und der Wert für λ_{\max} steigt. Rechts ist die 96-well Mikrotiterplatte der ARS-Titration abgebildet. Die Reihe 1 enthält jeweils die Blindprobe (Puffer+ARS), Reihe 2 eine 1:10 Mischung des ARS zu Boroxol und die Reihen 3-8 das Gemisch aus ARS und Boroxol, sowie unterschiedlich molare Mengen des jeweiligen Diols. Reihe A = Tetrapeptid, Reihe B = Fructose, Reihe C = Glucose, Reihe D = Ribose.

Im Zuge des Experiments wurden Stammlösungen der Reaktanden ARS, Benzoboroxol und der jeweiligen Dirole mit gewünschten Konzentrationen des wässrigen Kaliumphosphatpuffers in den 96-well Mikrotiterplatten angesetzt. Die Konzentration des ARS wurde konstant bei 0.1 mM, die des Boroxols bei 1.0 mM gehalten. Anschließend wurden unterschiedliche Diol-Konzentrationen im Bereich zwischen 1.0 - 6.0 mM der Fructose, der Ribose, der Glucose und des RbS-enhaltenden Peptids zu dem ARS/Boroxol Gemisch titriert und Messreihen mit dreifacher Wiederholung aufgenommen. Da sich bei der Glucose-Titration keine Änderung des Absorptionsmaximums ergab, wurde diese Messreihe hier nicht aufgeführt. Nachfolgend sind nun die Absorptionsspektren der verschiedenen Dirole abgebildet.

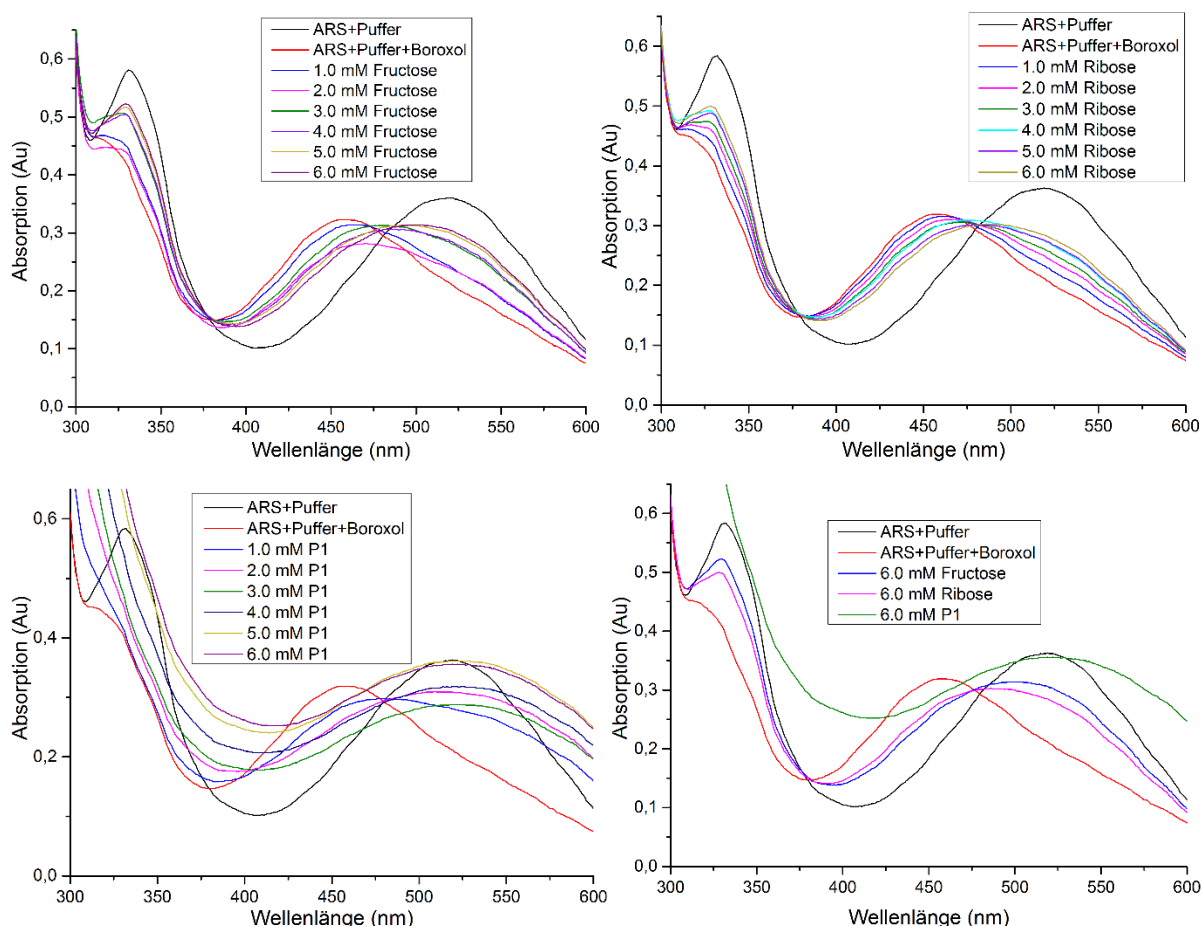


Abbildung 53. UV/Vis Spektren der Titration von ARS mit Boroxol und verschiedenen Diolen. Im Spektrum oben links ist die Versuchsreihe mit Fructose bei den Konzentrationen 1.0 - 6.0 mM gezeigt. Oben rechts die entsprechende Versuchsreihe für Ribose, unten links für das Tetrapeptid **P1** (Ile-RbS-Ala-Gly). Eine Gegenüberstellung aller verwendeter Diolen ist bei einer Konzentration von 6.0 mM unten rechts aufgeführt.

Aus den erhaltenen Absorptionsspektren geht hervor, dass zwar alle Diolen (außer Glucose) in der Lage sind, das ARS aus der Bindung zum Boroxol zu verdrängen, dies jedoch im unterschiedlichen Maß geschieht. Eine Einstufung über die Affinität der verwendeten Diolen kann einerseits über die Verschiebung des Absorptionsmaximums in Richtung des λ_{max} des freien ARS getroffen werden und zum anderen über die Diol-Konzentration, bei welcher eine Verdrängung des ARS im Spektrum bereits sichtbar wird. Ein Vergleich der Absorptionsmaxima der Diolen in Abhängigkeit der Konzentration ist in Abbildung 54 graphisch dargestellt.

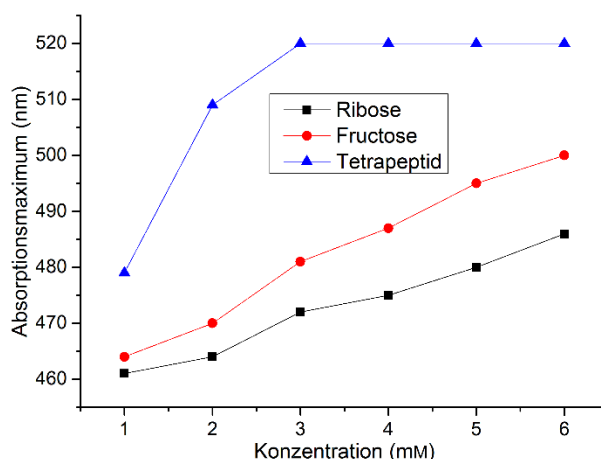


Abbildung 54. Graphische Darstellung der Abhängigkeit der Absorptionsmaxima von der Konzentration der jeweiligen Diole. Der Wert für λ_{\max} der Blindprobe des freien ARS lag bei 520 nm.

Aus der gezeigten Auftragung von λ_{\max} gegen die Konzentration der Diole geht hervor, dass das Tetrapeptid mit RbS **P1** die größte Affinität zum Boroxol aufweist. Sowohl der konzentrationsabhängige Anstieg von λ_{\max} als auch der generelle Wert von λ_{\max} sprechen für dieses Ergebnis. Des Weiteren liegt die Affinität der Fructose über der der Ribose. Diese Tendenz nimmt über den titrierten Konzentrationsbereich mit steigender Konzentration sogar noch zu - die Werte für λ_{\max} für Fructose steigen schneller als für Ribose.

Trotz der Tatsache, dass die UV/Vis Titration auf eine gute Affinität des RbS-enthaltenen Peptids gegenüber dem Boroxol hindeutet, können die Ergebnisse nicht auf die grundsätzliche Bindungsaffinität von Boroxol zu RbS übertragen werden, da die NMR-Experimente in wässrigem Kaliumphosphatpuffer bei pH = 7.4 nicht auf eine Veresterung beider Komponenten miteinander hindeuten. Somit wurden hier kontroverse Ergebnisse erhalten, welche keine eindeutige Aussage über die Affinität des Boroxols gegenüber RbS-Bausteinen in wässrigen Puffersystemen zulassen.

3.1.8 Konkurrenzexperiment der Veresterung zwischen dem Dekapeptid und Adenosin mit Phenylboronsäure und 3-Carboxyphenylboronsäure

Adenosin ist mit seinem *cis*-1,2-Diol ein bekanntes Motiv zur Bindung von Boronsäuren.^[265] Als Bestandteil der RNA kann es zum Beispiel über die Anbindung von Boronsäuren mit fluoreszierenden Resten detektiert werden. Für einen Vergleich der Affinität zwischen der Ribofuranose, welche in Adenosin vorkommt, und der Ribopyranose in Bezug auf ihre Veresterungstendenz mit Boronsäuren, wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt. Die

pyranoide Form der Ribose wurde dabei in Form des bekannten Dekapeptids **P19** (TTYADFIAR*b*SG) eingesetzt und als Boronsäure wurde Phenylboronsäure verwendet. In äquimolaren Mengen wurden alle drei Komponenten in 0.6 mL DMSO_{d6} im NMR-Röhrchen vereint und vermessen. In einem weiteren Röhrchen wurde parallel dazu der Umsatz von Adenosin mit Phenylboronsäure bestimmt, indem die Proben in regelmäßigen Zeitabständen von 20 min und 4 Std. nach Ansetzen der Lösungen ¹H-NMR-spektroskopisch vermessen wurden. Somit konnten die nötigen Spektren in Abbildung 55 zusammengestellt werden, um eine Aussage bezüglich der unterschiedlichen Affinitäten der beiden Zucker-Formen zu treffen.

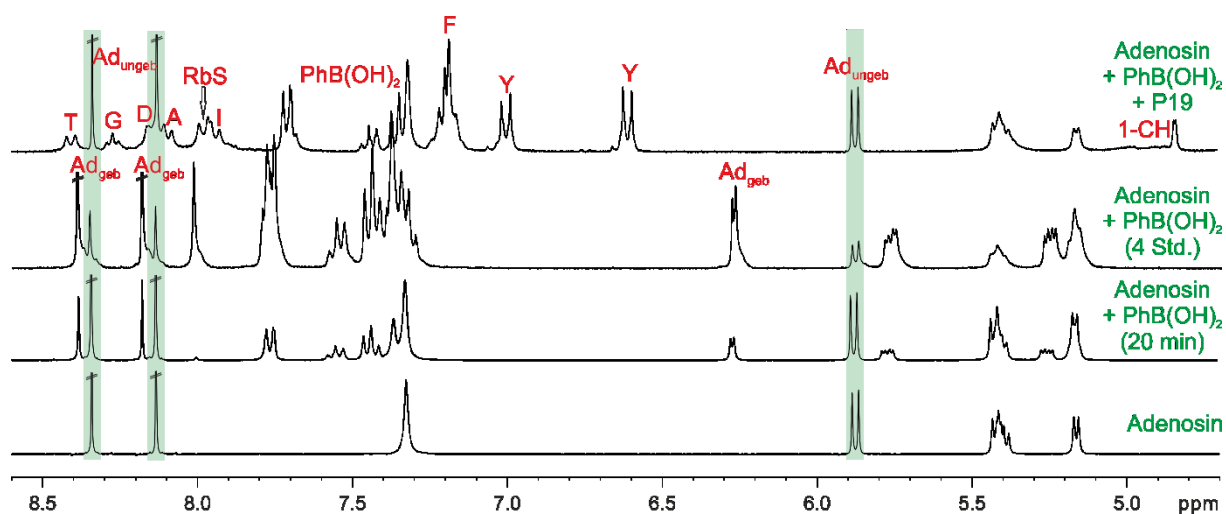


Abbildung 55. Gegenüberstellung der ^1H -NMR-Spektren (300 MHz, 300 K, DMSO_{d_6}) der Konkurrenzreaktion zwischen Adenosin und dem Dekapeptid **P19** gegenüber der Phenylboronsäure. Im unteren Spektrum ist reines Adenosin zu sehen, die beiden darüber liegenden Spektren zeigen die allmähliche Veresterung des Adenosins mit Phenylboronsäure. Aufgrund der sehr langsamen Umsetzung ist von einer geringen Affinität auszugehen. Im oberen Spektrum ist das Konkurrenzexperiment abgebildet. Sowohl anhand der Tieffeld-Verschiebung des anomeren Protons, als auch anhand der Adenosin-Signale verglichen mit dem Edukt-Spektrum, kann von einer ausschließlichen Veresterung der Boronsäure mit dem Dekapeptid ausgegangen werden. Die Signale des ungebundenen Adenosins sind grün hinterlegt.

Anhand der grün hinterlegten Signale (ungebundenes Adenosin) in den Spektren ist zu beobachten, dass Adenosin in Konkurrenz zum Dekapeptid **P19** nicht von der Boronsäure verestert wird. Neben diesem Indiz, dass im oberen Spektrum kein zweiter Signalsatz für die gebundene Form des Adenosins auftaucht, kann die typische Tieffeld-Verschiebung des anomeren Protons der RAS des Dekapeptids **P19** verzeichnet werden. Durch diese beiden Beobachtungen kann von einer ausschließlichen Veresterung des Dekapeptids **P19** ausgegangen werden. Die Bevorzugung einer Pyranose gegenüber einer Furanose ist für die Boronsäuren jedoch eher untypisch, genau wie die Präferenz der Veresterung von *cis*-1,3-

Diolen gegenüber den *cis*-1,2-Diolen.^[266] Somit lieferte dieses Konkurrenzexperiment ein unerwartetes Ergebnis. Aus diesem Grund wurde die Messung mit einer weiteren Boronsäure wiederholt, dieses Mal mit einem elektronenziehenden Substituenten - einer Carboxy-Gruppe, in *meta*-Position. Die erhaltenen ¹H-NMR-Spektren lieferten jedoch die gleichen Ergebnisse, wie die Titration mit Phenylboronsäure. Die elektronenärmere Boronsäure reagiert ebenfalls bevorzugt mit dem RbS-enthaltenden Peptid, statt mit Adenosin. Es konnte jedoch im zeitlichen Verlauf eine verlangsamte Veresterung des RbS-Bausteins mit der 3-Carboxyphenylboronsäure gegenüber der unsubstituierten, elektronenreicheren Boronsäure beobachtet werden. Eine Gegenüberstellung der gemessenen ¹H-NMR-Spektren mit 3-Carboxyphenylboronsäure ist in Abbildung 56 zu sehen.

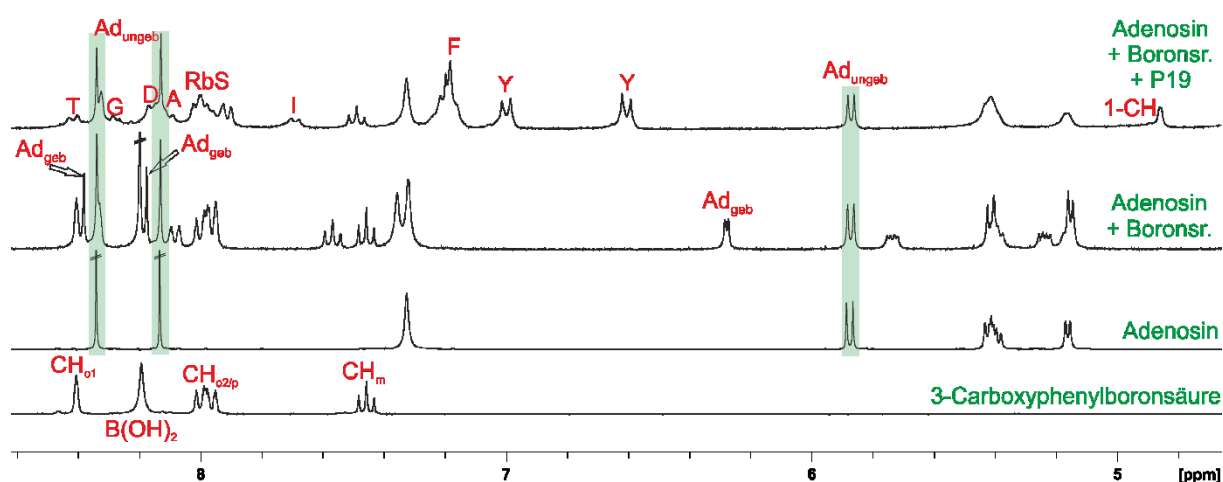


Abbildung 56. Gegenüberstellung der ^1H -NMR-Spektren (300 MHz, 300 K, DMSO-d_6) der Konkurrenzreaktion zwischen Adenosin und dem Dekapeptid **P19** gegenüber der 3-Carboxyphenylboronsäure. Es ist die gleiche Tendenz der bevorzugten Umsetzung zwischen der Boronsäure und dem Dekapeptid **P19** wie in Abb. 55 zu beobachten.

3.2 Methoden der kovalent reversiblen Ligation und ihre Funktion

Für eine kovalent reversible Ligation zwischen Peptiden und niedermolekularen Inhibitoren stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (Abb. 57). Die wohl gängigste Ligations-Methode ist die Oxidation zweier Thiole miteinander zu einer Disulfid-Brücke.^[267] Die kovalente Disulfid-Bindung kann aus einer spontanen Autoxidation zweier Thiole mit Luftsauerstoff hervorgehen und lässt sich reversibel unter Zugabe von Reduktionsmittel wie Dithiothreitol oder β -Mercaptoethanol wieder spalten. Über die Einführung eines Thiol-Linkers können außerdem zwei Peptide (A und B) mit einem beliebigen Abstand zueinander verknüpft werden und somit in Wechselwirkung treten. Eine weitere Ligations-Methode ist die Ubiquitinierung, welche in erster Linie der Zellregulierung dient. Dies geschieht über die ATP-

vermittelte Anbindung von Ubiquitin (Ub) an ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) und die anschließende Übertragung auf die Thiol-Gruppe eines Cysteins eines weiteren Enzyms (Transportenzym T). Das Transportenzym wiederum vermittelt letztlich den Ubiquitin-Transfer auf das Proteinsubstrat (S) (teilweise durch einen weiteren Enzym-Enzym-Transfer „T auf E2“ unterbrochen).^[268] In dieser Arbeit wird sich einer dritten Methode bedient, welche die Ligation des Substrats mit dem Inhibitor vorsieht. Dabei wird die katalytische Untereinheit (C) über die Verknüpfung zwischen Inhibitor (F = Fasudil®) und Substrat-Sequenz (S) angebunden, sodass diese in Wechselwirkung miteinander treten können.^[216-218] Die Ligation des Zielobjekts über eine Boroxol-Spezies (B) an tRNA-Synthetase zur Anbindung eines Proteins ist die letzte, hier vorgestellte Methode. Die eigentliche Wirkungsweise der tRNA-Synthetase basiert auf der katalysierten Anbindung der richtigen Aminosäure an die tRNA während der Translation des genetischen Codes. Während der Aminosäure Aktivierung wird eine Enzym-gebundene Aminoacyl-Adenylat-Spezies gebildet, welche anschließend auf eine der beiden freien Hydroxygruppen des Adenosins der tRNA übertragen wird. Da in Anwesenheit des Boroxols die Affinität zu den freien Hydroxygruppen größer ist, wird das Boroxol jedoch bevorzugt gebunden, sodass eine Inhibition des Mechanismus stattfindet.^[269] Der Fokus dieser Arbeit liegt jedoch auf einer weiteren Ligations-Variante, die in den folgenden Kapiteln weiter erläutert wird.

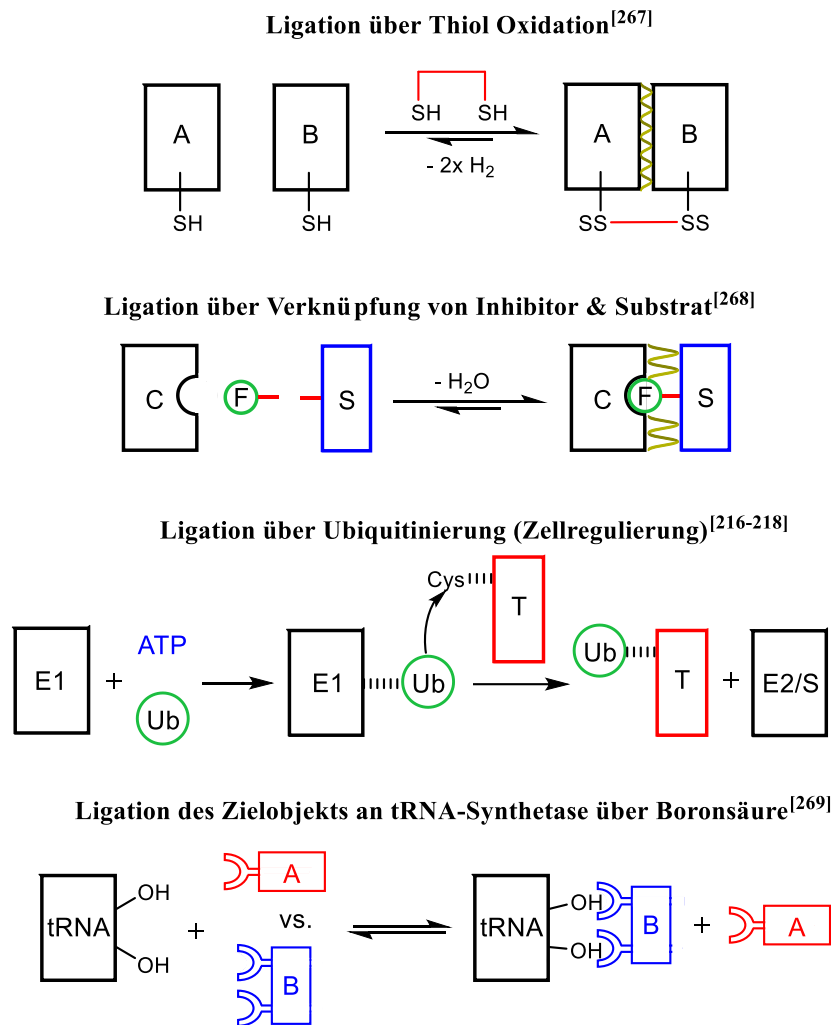


Abbildung 57. Übersicht verschiedener Methoden der reversibel kovalenten Ligation zwischen Enzymen, Peptiden oder niedermolekulare Inhibitoren.^[216-218,267-269] Zu den gängigsten Methoden der Ligation gehören die Disulfid-Verbrückung durch Oxidation zweier Cysteine und die Ubiquitinierung im Zuge der Zellregulierung. Eine weitere Möglichkeit der Verknüpfung bietet der Ansatz der Bisubstrat-Inhibitoren, bei welchem der Inhibitor mittels kovalent reversibler Bindung an das Substrat gebunden wird. Eine weitere, von ROCK *et al.* entwickelte Methode ist die Ligation an tRNA-Synthetase über die Boronsäuren.

3.3 Synthese und Auswahl der modifizierten PKI Sequenzen

Wie Eingehens bereits erwähnt, wurde als Leitstruktur für die Einführung des Bisubstrat-Inhibitors, basierend auf der kovalent reversiblen Boronsäureveresterung mit einem Zucker-Rest, die Proteinkinase A gewählt. Da diese Enzymklasse besonders weitreichend erforscht, und der Wirkmechanismus gut verstanden ist, konnten sich daraus Vorteile geschaffen werden, indem die bereits vorhandenen Kristallstrukturen eingehend auf potentielle Mutationsstellen für die Einbringung der RAS untersucht wurden. Abbildung 58 zeigt die beiden Sequenzen

(Substrat- und Inhibitor-Sequenz), welche im Zuge dieser Arbeit an diversen Positionen modifiziert wurden, um einen affinen Bisubstrat-Inhibitor zu generieren. Auch auf diesem Gebiet konnte auf zahlreiche Vorarbeiten zurückgegriffen werden, da sowohl die optimale Länge der Sequenz, als auch die prädestinierte Anordnung der einzelnen Aminosäuren in Bezug auf die Affinität zum Enzym weitreichend untersucht wurden.^[270,271,272]

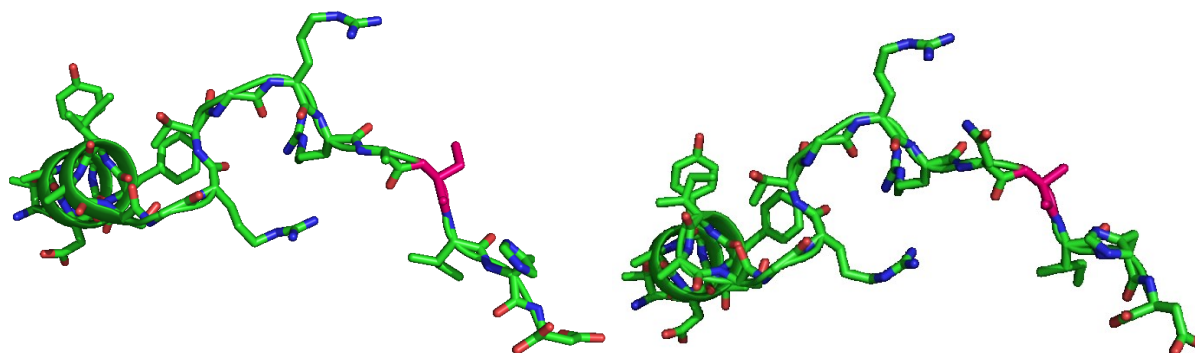


Abbildung 58. Ausschnitt aus den Kristallstrukturen mit den PDB-Codes: 1L3R und 1ATP.^[193,199] Gezeigt ist jeweils ein Teil des Proteins, der als Substrat-Sequenz, bzw. enzymeigener Inhibitor fungiert. Die Sequenz rechts enthält an der Position 21 ein Serin (pink), welches im Zuge der Aktivierung phosphoryliert wird. Bei der linken Sequenz handelt es sich um den entsprechenden Inhibitor, bei dem das Serin gegen ein Alanin ausgetauscht ist und somit keine Aktivierung erfolgen kann.

Die minimale Länge, die die PKI-Sequenz für Affinitätswerte im niedrigen nanomolaren Bereich aufweisen muss, wurde auf die Aminosäuren 6-22 bestimmt.^[270] Die C-terminalen Aminosäuren Histidin und Asparaginsäure sind nicht für eine Erhöhung der Affinität relevant und können somit bei der PKI Synthese vernachlässigt werden. Im N-terminalen Teil der Sequenz befindet sich ein α -helicaler Bereich (p^{-16} - p^{-9}), welcher vermutlich in einen β -turn mündet, der durch Ser¹³ und Gly¹⁴ eingeleitet wird (p^{-8} - p^{-4}).^[270] Der Nachweis der α -Helix wurde von REED *et al.* mittels ¹H-NMR-Spektren verifiziert, da dort überwiegend Kopplungskonstanten von unter 6.0 Hz für die Kopplung zwischen dem α -Proton und dem NH erhalten wurden, sowie drei oder mehr Spin-Spin-Kopplungskonstanten für ³ $J_{\alpha H, NH}$.^[270,271,272] Die Aminosäuren Tyr⁷, Phe¹⁰, Asn²⁰ und Ile²² gehen Wechselwirkungen mit dem Enzym ein, genau wie die drei Arginine auf den Positionen p^{-6} , p^{-3} und p^{-2} , welche in ionische Wechselwirkungen mit den Resten Glu¹²⁷ und Glu²³⁰ im aktiven Zentrum des Enzyms integriert sind. Das Glycin auf Position p^{-4} ist ebenfalls für eine erfolgreiche Anbindung essenziell, da an dieser Stelle keine sterisch anspruchsvollen Reste toleriert werden.^[191,270] Ile²² liegt in einer hydrophoben Tasche, die von den Resten Leu¹⁹⁸ und Leu²⁰⁵ ausgebildet wird und liefert somit ebenfalls einen wichtigen Beitrag für die Affinität.^[191] Eine Übersicht der zuletzt genannten Merkmale ist in Abbildung 59 dargestellt.^[274]

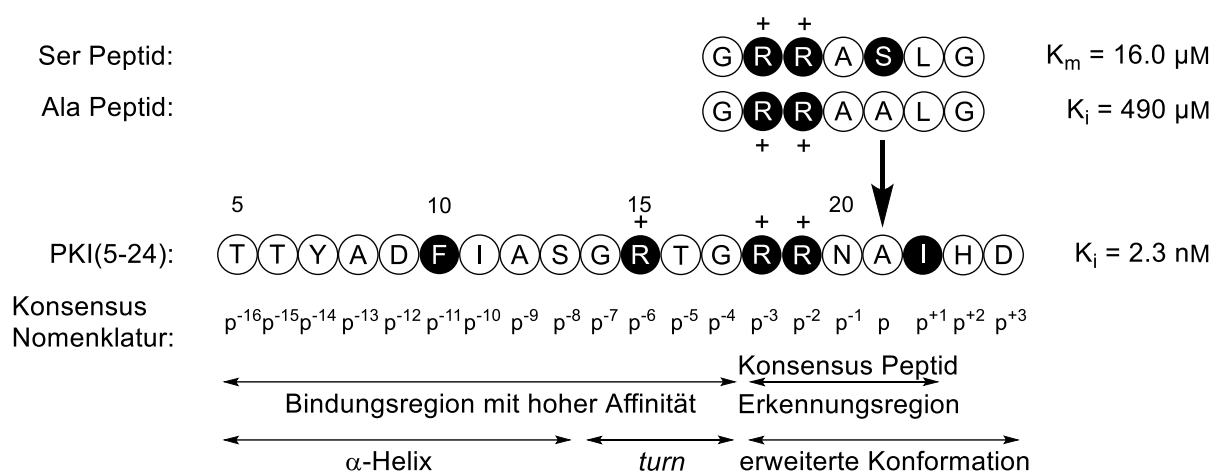


Abbildung 59. Substrat- und Inhibitor-Sequenz der PKA. Das Substrat-Peptid trägt an Position 21 das zu phosphorylierende Serin statt des Alanins im Inhibitor Peptid. Die gemessenen Affinitäten für PKA mit ATP und Mg^{2+} sind rechts aufgeführt. Die für die Bindung an PKA erforderlichen Reste sind schwarz hinterlegt. Die Konsensus-Region beinhaltet die AS von p^{-3} bis p^{+1} . Mittels Alanin-Scan wurden die einzelnen Komponenten auf ihre Wichtigkeit in Bezug auf die Affinität zu PKA überprüft.^[274]

Ein Großteil der genannten Informationen wurde aus diversen Kristallisationsansätzen mit PKI erhalten.^[193,199] Dafür wurden im Allgemeinen das Enzym, die Inhibitor-Sequenz, Magnesiumionen (Mg^{2+}) und ATP in Pufferlösungen miteinander vereint und bei 4 °C zur Kristallisation gelagert, wobei der ternäre Komplex entstand. Auf Basis dessen wurden vielerlei Kombinationen für mögliche Kristallisationen getestet, indem die Verwendung der Inhibitor-Sequenz und der Metalle variiert, ATP entfernt oder ein weiterer niedermolekularer Inhibitor hinzugefügt wurden.^[199,200,272] Verglichen mit der Strukturanalyse der Inhibitor-Sequenz im Kristall, ergaben die Untersuchungen des PKI-Peptids in Lösung keine derart eindeutigen Ergebnisse, da nicht von einer Vorzugskonformation gesprochen werden konnte, sondern die erhaltenen Werte der Untersuchungen auf eine Mittelung der Konformationen hindeuteten.^[271,276] Die in dieser Arbeit synthetisierten Sequenzen wurden unter Zuhilfenahme dieser Informationen ausgesucht und mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese hergestellt. Anschließend wurden diese sowohl NMR-spektroskopisch untersucht, als auch zu Kristallisationszwecken der pharmazeutischen Abteilung des Arbeitskreises KLEBE zur Verfügung gestellt. Die Synthese und die Auswahl der Sequenzen wird im Folgenden genauer erläutert. Zunächst wurde für einen Kompatibilitätstest der ribopyranosylierten Aminosäuren innerhalb der Inhibitor- bzw. Substrat-Sequenz das bereits vorhandene Serin gegen das Riboserin ausgetauscht und analysiert. Da das Serin in dieser Position keine, für die Affinität zur PKA essentielle Funktion ausübt, eignete sich diese Position sehr gut zu Testzwecken. Im Anschluss wurde anhand von Kristallstrukturen nach einer geeigneten Position für die Mutation

gesucht, um dem aktiven Zentrum des Enzyms mit der eingebauten RAS-Seitenkette möglichst nahe zu kommen, ohne die Affinität maßgeblich zu beeinflussen. Eine Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Sequenzen und ihre Lage im Proteinkomplex sind in Abbildung 60 farbig dargestellt.

| | | |
|-------------------------------|---|-----|
| TTYADFIASGRTGRRASI | PKA ⁵⁻²² | P20 |
| TTYADFIASGRTGRRARbSI | PKA(RbS ²¹) ⁵⁻²² | P21 |
| TTYADFIASGRTGRRNAIDH | PKI ⁵⁻²⁴ | P23 |
| TTYADFIASGRTGRRNAI | PKI ⁵⁻²² | P24 |
| TTYADFIA RbS GRTGRRNAI | PKI(RbS ¹³) ⁵⁻²² | P25 |
| TTYADFIASGR RbT GRRNSI | PKI(RbT ¹⁶) ⁵⁻²² | P26 |
| TTYADFIASGRT RbS RRNSI | PKI(RbS ¹⁷) ⁵⁻²² | P27 |
| TTYADFIASGRTG RbS RNAI | PKI(RbS ¹⁸) ⁵⁻²² | P28 |
| TTYADFIASGRTGR RbS NSI | PKI(RbS ¹⁹) ⁵⁻²² | P29 |
| TTYADFIASGRTGRR RbS AI | PKI(RbS ²⁰) ⁵⁻²² | P30 |
| TTYADFIASGRTGRRNRbSI | PKI(RbS ²¹) ⁵⁻²² | P31 |

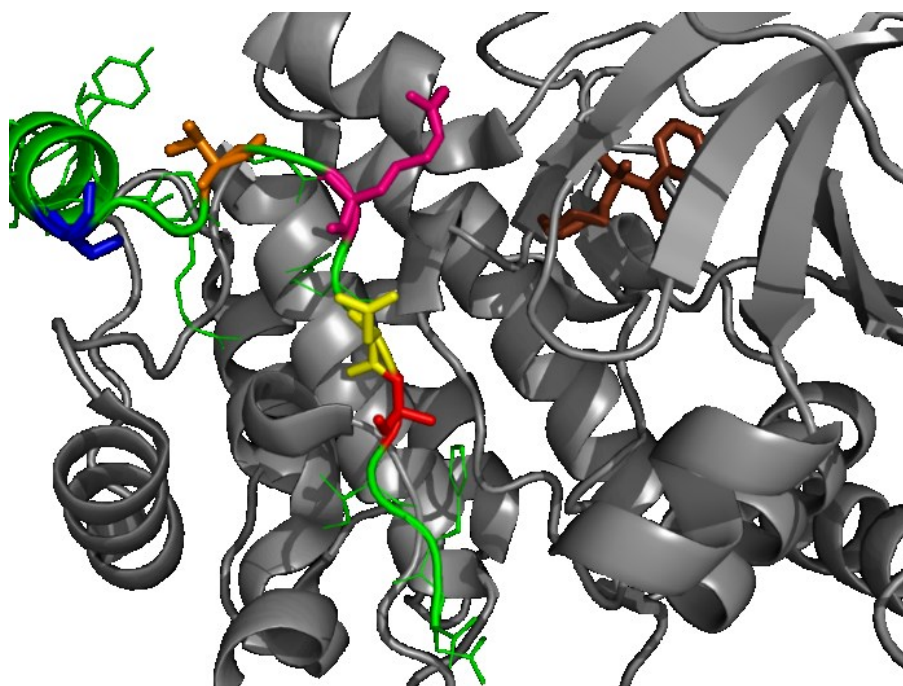


Abbildung 60. Oben: Übersicht der synthetisierten Sequenzen **P20-P31** und die entsprechende Benennung. Die eingeführte RAS-Mutation ist rot markiert. Die drei obersten Sequenzen sind den nativen Peptiden nachempfunden und wurden zu Vergleichszwecken synthetisiert. Da sich der PKI⁵⁻²⁴ aufgrund der Verwendung des Histidin-Harzes nicht sehr gut an die Asparaginsäure kuppeln ließ und die Affinität durch das Weglassen der beiden Aminosäuren nicht beeinflusst wird, wurde in den darauffolgenden Sequenzen erst bei Ile²² begonnen. Unten ist ein Ausschnitt des Proteinkomplexes gezeigt mit den entsprechend farbig hervorgehobenen Positionen der RAS-Modifikation. In braun ist der Inhibitor Fasudil® markiert (PDB-Code: 1Q8W).^[203]

Eine übersichtliche Auflistung der synthetisierten PKI-Peptide und ihre Eingliederung in verschiedene Bereiche ist in Abbildung 61 zu finden.

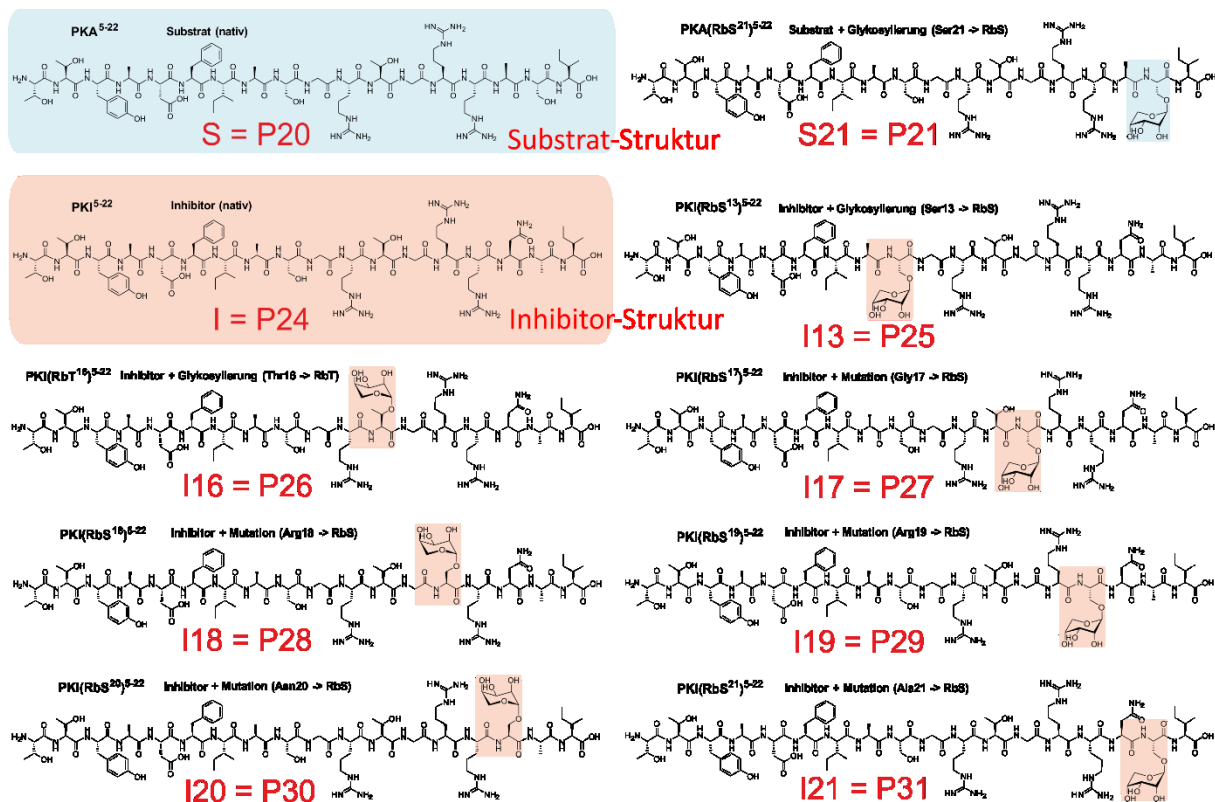
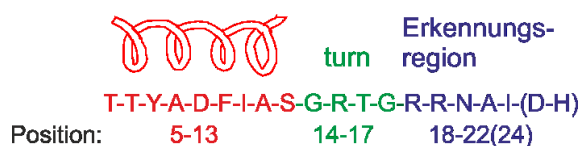


Abbildung 61. Eingliederung der synthetisierten PKA (blau) und PKI (rot) Sequenzen in drei Bereiche. In blau sind die beiden hergestellten Substrat-Sequenzen (**P20**, **P21**) dargestellt und in rot die Inhibitor-Sequenzen mit RbS Mutationen (**P24**, **P27-P31**) sowie die Inhibitor-Sequenzen mit Glykosylierungen (Ser gegen RbS - **P25** und Thr gegen RbT - **P26**).

Wie in Abbildung 61 zu sehen ist, wurden die Reste 16-21 jeweils gegen RbS bzw. RbT mutiert. Auch die natürlichen Sequenzen wurden zu Analysezwecken synthetisiert und für Affinitäts-tests zum Vergleich in die pharmazeutische Abteilung gegeben.

Aus vorherigen Peptidsynthesen konnte bereits bestätigt werden, dass der Einsatz der RAS am Peptidsynthesizer ohne Probleme möglich ist, weshalb die RAS Bausteine wie jede andere Aminosäure verwendet werden konnte. Im Anschluss an die abgeschlossene Peptidsynthese wurden die Rohpeptide stets mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt und NMR-spektroskopisch untersucht. Die Peptide wurden dafür in 0.6 mL Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH = 3.0)/D₂O 9:1 gelöst und vermessen. Die Zuordnung der Protonen in den erhaltenen ¹H-NMR-Spektren erfolgte unter Zuhilfenahme der 2D-Spektren und war zumeist, trotz auftretender Signalüberlappung vollständig möglich.



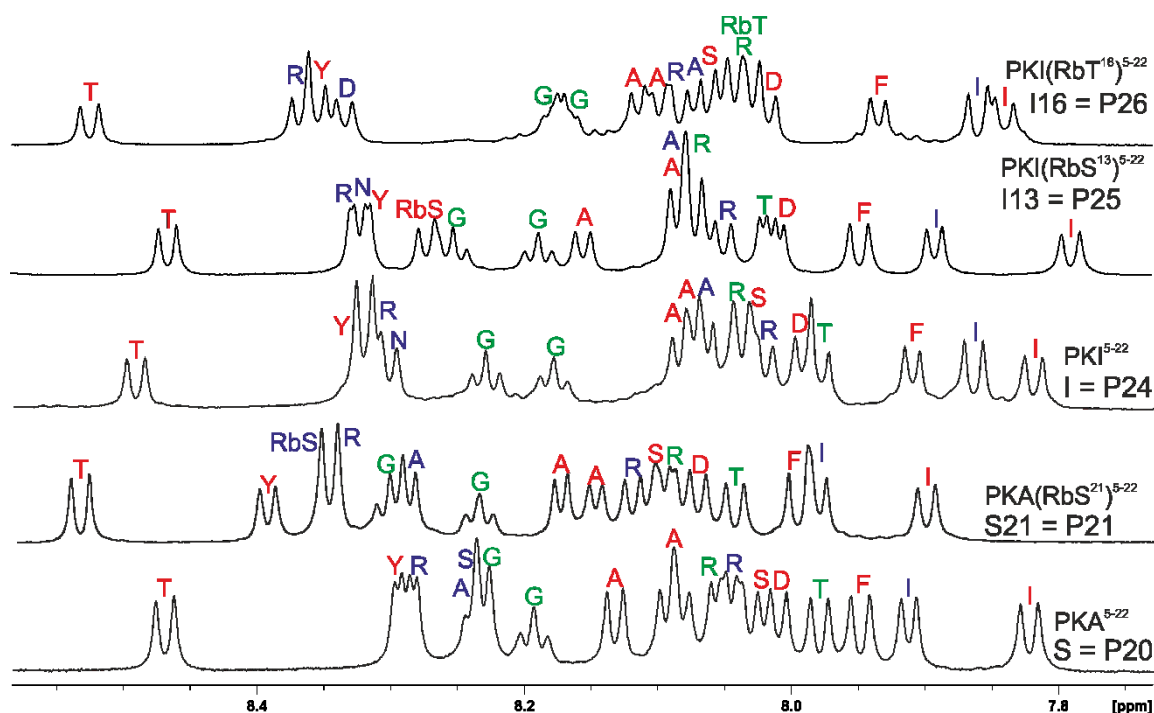


Abbildung 62. Übersicht der ^1H -NMR-Spektren der synthetisierten PKA und PKI Sequenzen (600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/ D_2O 9:1). Gezeigt ist der aromatische Bereich von 8.6 - 7.7 ppm und die entsprechende Zuordnung. Die Einteilung in die drei Farben erfolgte nach Zugehörigkeit in helicale (rot), *turn* (grün) und Erkennungsregion (blau) - siehe Seite 83 unten.

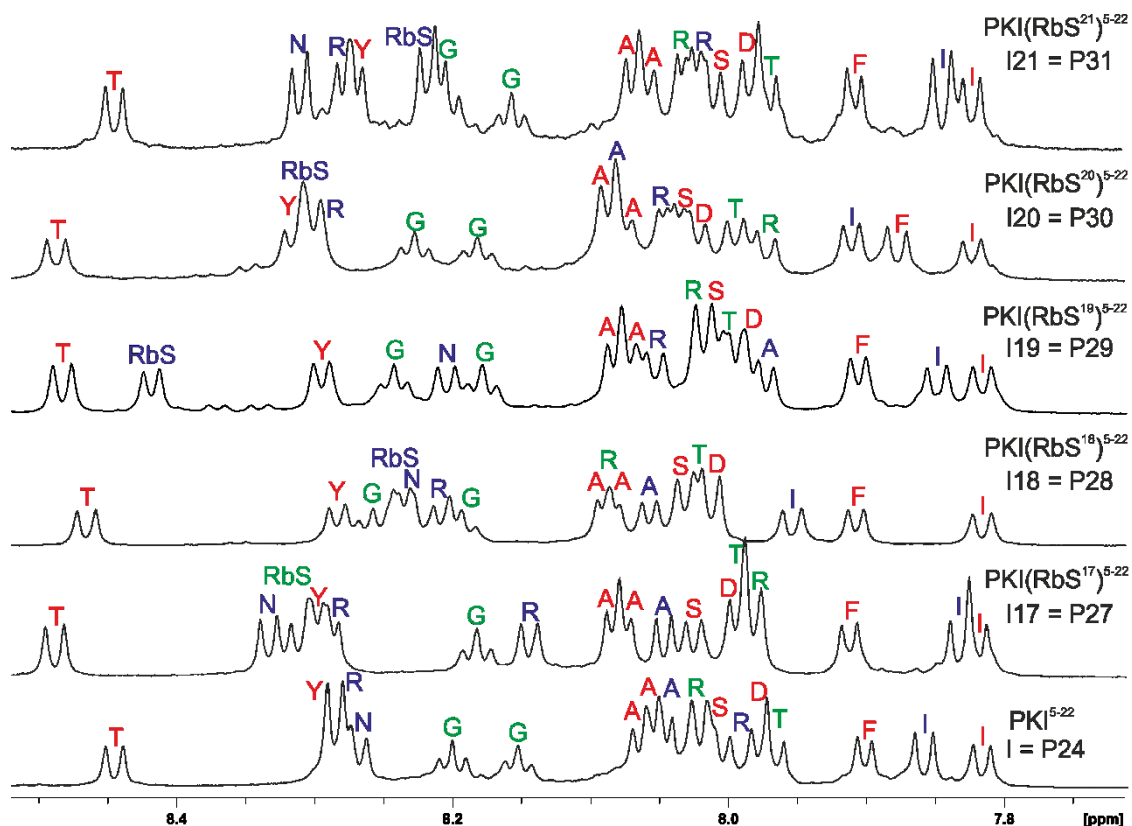


Abbildung 63. Übersicht der ^1H -NMR-Spektren der synthetisierten PKI Sequenzen (600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/ D_2O 9:1). Gezeigt ist der aromatische Bereich von 8.6 - 7.7 ppm und die entsprechende Zuordnung der NH-Signale. Im untersten Spektrum ist die native PKI Sequenz gezeigt, alle anderen Sequenzen tragen eine RAS-Mutation (RbS/RbT).

Generell können viele Ähnlichkeiten bei den chemischen Verschiebungen der NH-Signale zwischen den synthetisierten Peptidsequenzen beobachtet werden. Der Einfluss der RAS-Mutation auf die benachbarten Aminosäuren ist in jedem Spektrum sichtbar. Die chemische Verschiebung des RbS-NH-Signals variiert in einem Bereich von 8.4 - 8.2 ppm, wobei das NH-Signal des RbT im Peptid PKI(RbT¹⁶)⁵⁻²² **P26** im Vergleich zu allen RbS-Signalen sehr stark Hochfeld verschoben ist (8.0 ppm). Weiterhin wurden auch die prochiralen Protonen des Serins und die des Riboserins, sowie die β -Protonen der Threonine miteinander verglichen und tabellarisch aufgelistet. Dabei lässt sich eine hohe Konsistenz der Werte, trotz der verschiedenen, eingeführten Mutationen in der Sequenz, feststellen.

Tabelle 6. Übersicht über die prochiralen Protonen des Serins und Riboserins und der β -Protonen der Threonine in den verschiedenen PKI-Sequenzen.

| | Ser ¹³ | Ser ¹³ | RbS ^x | RbS ^x | Thr ⁵ | Thr ⁶ | Thr ¹⁶ |
|---|--|--|--|--|---|---|---|
| | ³ J _{α,β} Tieffeld | ³ J _{α,β} Hochfeld | ³ J _{α,β} Tieffeld | ³ J _{α,β} Hochfeld | ³ J _{α,β} | ³ J _{α,β} | ³ J _{α,β} |
| PKI⁵⁻²⁴ P23 | 5.6 | 4.6 | - | - | 6.7 | 6.4 | 6.6 |
| PKA⁵⁻²² P20 | 5.5 | 4.8 | - | - | n.n. | 6.3 | 6.6 |
| PKA(RbS²¹)⁵⁻²² P21 | 6.5 | 4.8 | 4.8 | 4.6 | 6.7 | 6.3 | 6.5 |
| PKI⁵⁻²² P24 | 5.5 | 4.9 | - | - | 6.7 | 6.2 | 6.7 |
| PKI(RbS¹³)⁵⁻²² P25 | - | - | 5.4 | 4.2 | 6.9 | 6.3 | 6.6 |
| PKI(RbT¹⁶)⁵⁻²² P26 | 6.4 | 4.9 | - | - | 6.6 | 6.2 | 6.5 |
| PKI(RbS¹⁷)⁵⁻²² P27 | 5.8 | 4.9 | 5.2 | 4.6 | 6.7 | 6.3 | 6.5 |
| PKI(RbS¹⁸)⁵⁻²² P28 | 6.5 | 4.8 | 4.8 | 4.6 | 6.7 | 6.3 | 6.5 |
| PKI(RbS¹⁹)⁵⁻²² P29 | 6.3 | 4.9 | 5.3 | 4.6 | n.n. | 6.2 | 6.6 |
| PKI(RbS²⁰)⁵⁻²² P30 | 6.3 | 4.5 | n.n. | 3.2 | 6.5 | 6.3 | 6.6 |
| PKI(RbS²¹)⁵⁻²² P31 | n.n | 4.8 | 4.6 | 4.4 | n.n. | 6.3 | 6.6 |

Aus vorhandenen Kristalldaten geht hervor, dass es sich beim PKI um ein Peptid mit helikalem Anteil im Bereich des *N*-Terminus handelt.^[193,199] Ob das Peptid diese Konformation auch in Lösung bevorzugt einnimmt, wurde daher mittels NMR- und CD-Spektroskopie unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht. Die Helix-Struktur im Kristall wird von den Aminosäuren Thr⁶-Ser¹³ gebildet und sollte somit durch einige Wasserstoffbrücken und zusätzliche intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen durch NOE-Kontakte charakterisiert werden können. Zunächst wurde die Temperaturabhängigkeit der Amid-Protonen in einer Temperaturreihe von 280-310 K in 10 K Schritten geprüft da Protonen, die sich in einer

Wasserstoffbrücke befinden, eine geringere temperaturabhängige Verschiebung durch ihre verringerte Exponiertheit zum umgebenden Lösungsmittel, erfahren. In der nachfolgenden Tabelle sind die Temperatur-Gradienten in ppb/K aufgelistet, die aus den erhaltenen Spektren sicher abgelesen werden konnten. Da sich viele Signale im Amid-Bereich der ^1H -NMR-Spektren überlagerten, konnten nur die unten aufgeführten Werte ermittelt werden.

Tabelle 7. Auflistung der ermittelten Temperaturgradienten aus den ^1H -NMR-Spektren der verschiedenen PKA/PKI Peptide. Die Spektren wurden am 600 MHz Spektrometer in Kaliumphosphatpuffer/ D_2O 9:1, pH = 3.0 bei 280-310 K in 10 K Schritten gemessen.

| Aminosäure | Gradient [ppb/K] | | | | | |
|-------------------------|------------------|------|------|------|-----------|-----------|
| | P23 | P24 | P26 | P28 | P29 | P30 |
| Thr⁶ | 6.4 | 6.5 | 6.8 | 6.6 | 6.7 | 6.7 |
| Tyr⁷ | 8.5 | 9.4 | 10.6 | 10.6 | 10.3 | 10.2 |
| Phe¹⁰ | 6.8 | 7.3 | 7.5 | 7.1 | 7.3 | 7.6 |
| Ile¹¹ | 7.8 | 8.1 | 7.9 | 7.9 | 8.3 | 8.1 |
| Gly¹⁴ | 4.2 | 4.3 | 5.2 | 4.7 | 4.0 | 4.2 |
| Gly¹⁷ | 6.5 | 6.8 | 5.7 | 7.3 | 7.0 | 6.8 |
| Arg¹⁹ | 9.2 | 10.1 | 7.7 | 7.2 | 8.0 (RbS) | 8.1 |
| Asn²⁰ | 7.0 | 8.1 | 7.7 | - | 6.3 | 7.9 (RbS) |
| Ile²² | 8.4 | 9.5 | 9.8 | 9.3 | 9.3 | 9.3 |

Die hohen Werte der Temperaturgradienten weisen darauf hin, dass die Amid-Protonen eher nicht in Wasserstoffbrückenbindungen eingebunden sind. Die erhaltenen Werte für die Aminosäuren in der *N*-terminalen, vermeintlich helikalen Region des Peptids, liefern Werte im Bereich zwischen 6.4 und 10.6 ppb/K, was für das Vorliegen des Peptids als *random coil* Struktur spricht. Dementsprechend liegt die Vermutung nahe, dass für die Ausbildung einer Vorzugskonformation die Umgebung des Proteins nötig ist.

Darüber hinaus wurden zusätzlich die Kopplungskonstanten der vicinalen Kopplung zwischen den α - und Amid-Protonen der Aminosäuren des genannten Bereichs abgelesen und nach charakteristischen $^3J_{\alpha\text{H}/\text{NH}}$ -Werten gesucht, die im Falle einer α -Helix Werte < 6 Hz liefern würden.^[277] Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8. Auflistung der Werte der $\alpha\text{H}/\text{NH}$ Kopplungskonstanten der hergestellten PKI-Peptide. Gelistet sind die Aminosäuren, welche laut Literatur^[270] vermeintlich an der Ausbildung der α -Helix Struktur beteiligt sind.

| | P24 | P25 | P26 | P27 | P28 | P29 | P30 | P31 |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr⁶ | 8.0 | 8.2 | 8.0 | 8.2 | 8.3 | 8.1 | 8.2 | 8.1 |
| Tyr⁷ | 7.2 | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.1 | 6.9 | 7.2 | 7.0 |
| Ala⁸ | 6.0 | 6.1 | 5.9 | 5.8 | 5.8 | 6.0 | 5.8 | 6.0 |
| Asp⁹ | 6.8 | 6.8 | 6.4 | 6.7 | 6.1 | 6.8 | 6.8 | 6.8 |
| Phe¹⁰ | 6.8 | 6.8 | 6.6 | 6.7 | 6.8 | 6.6 | 6.5 | 6.7 |
| Ile¹¹ | 8.0 | 8.2 | 8.5 | 7.9 | 8.1 | 8.0 | 7.8 | 8.0 |
| Ala¹² | 6.0 | 6.2 | 6.5 | 6.0 | 5.5 | 6.3 | 5.4 | 6.1 |
| Ser¹³ | 8.2 | - | 6.5 | 7.0 | 6.9 | - | 7.0 | 7.0 |

Auch wenn die erhaltenen $\alpha\text{H}/\text{NH}$ -Kopplungskonstanten der verschieden mutierten/glykosylierten Peptide größtenteils übereinstimmen, so sind nur sehr wenige Werte < 6 Hz vorhanden. Lediglich die beiden Alanine an Position 8 und 12 weisen zum Teil kleinere Kopplungskonstanten im Bereich von 5.5-6.0 Hz auf. Dies reicht jedoch ebenfalls nicht aus, um das Vorliegen einer α -Helix ausreichend zu stützen, zumal in der Arbeit von REED *et al.* eine gezielte NMR-spektroskopische Untersuchung zum positiven Nachweis einer α -Helix durchgeführt wurde.^[271] Somit ist alles in allem davon auszugehen, dass die PKI-Peptide, unabhängig von einer RbS/RbT Mutation/Glykosylierung im Peptid, in Lösung keine Vorzugskonformation in Form einer α -Helix im *N*-terminalen Bereich einnehmen, da auch die erhaltenen Ergebnisse der CD-Messungen bestätigen, dass das Peptid als *random coil* in Lösung vorliegt (Abb. 64).

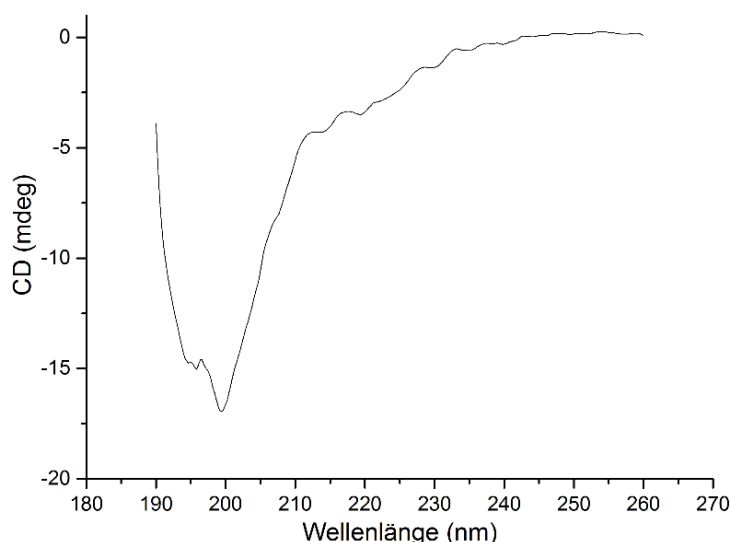


Abbildung 64. CD-Spektrum am Beispiel der PKI(RbS¹⁸)⁵⁻²² **P28** Sequenz, gemessen bei einer Peptid-Konzentration von 50 μ M in 5 mM Phosphatpuffer bei 27 °C. Der Kurvenverlauf deutet auf eine *random coil* Struktur hin und bestätigt somit die erhaltenen NMR-Daten. Alle weiteren PKI-Sequenzen ergaben sehr ähnliche CD-Spektren.

Die generelle Zuordnung der Signale der verschiedenen PKA/PKI Peptide konnte stets unter Zuhilfenahme von 2D-Spektren relativ zuverlässig durchgeführt werden. Trotz einiger Bereiche mit zum Teil ausgeprägten Signalüberlagerungen (NH-Bereich und α -Protonen-Bereich) wurden alle Protonen im jeweiligen Spektrum ermittelt und im Falle einer starken Überlappung als Multipllett-Bereich angegeben. Wie bereits zuvor beschrieben, liegen die Peptide in Lösung ohne Vorzugskonformation als *random coil* vor. Trotzdem weisen die Spektren eine relativ große Dispersion im NH-Bereich auf und die Multiplizitäten der nicht überlagerten Signale im Spektrum sind zum Großteil deutlich erkennbar, sodass das Ablesen der Kopplungskonstanten möglich ist. Die Zuordnung der Protonen ist in Abbildung 65 am Beispiel des PKI(RbS¹⁸)⁵⁻²² **P28** dargestellt und erfolgte mit Hilfe des *sequential walks* im darunter abgebildeten ROESY-Spektrum (Abb.66).

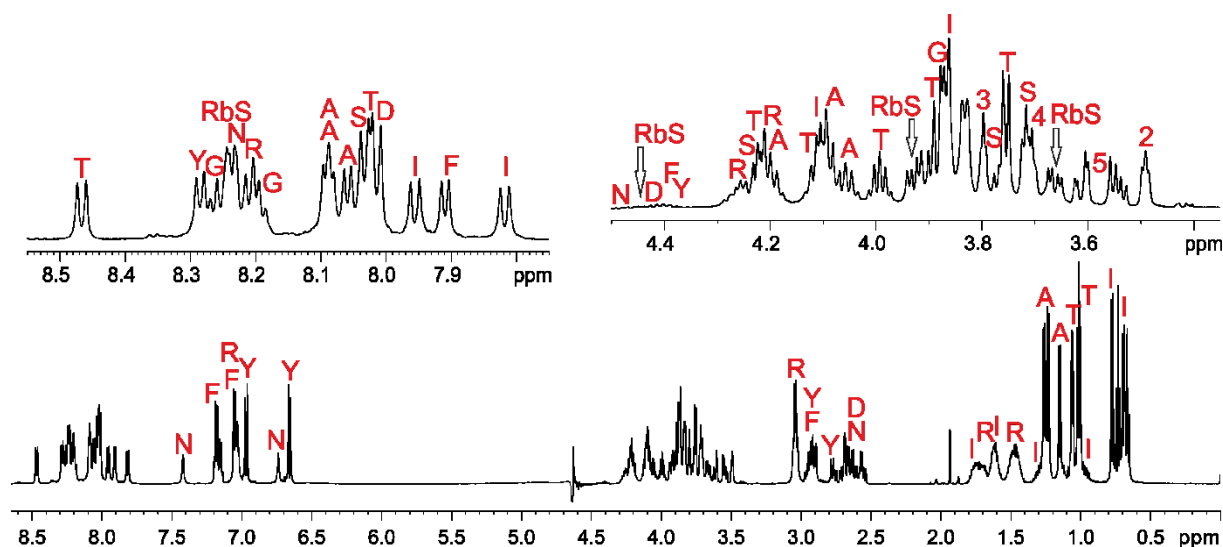


Abbildung 65. Exemplarische, vollständige Zuordnung der Protonen am Beispiel des Peptids PKI(RbS¹⁸)⁵⁻²² **P28** mit Hilfe von 2D-Spektren (600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/D₂O 9:1). Hervorgehoben ist der NH- und der α -Protonen-Bereich des Spektrums, da diese eine hohe Signaldichte aufweisen und es z.T. zu Signalüberlappung kommt.

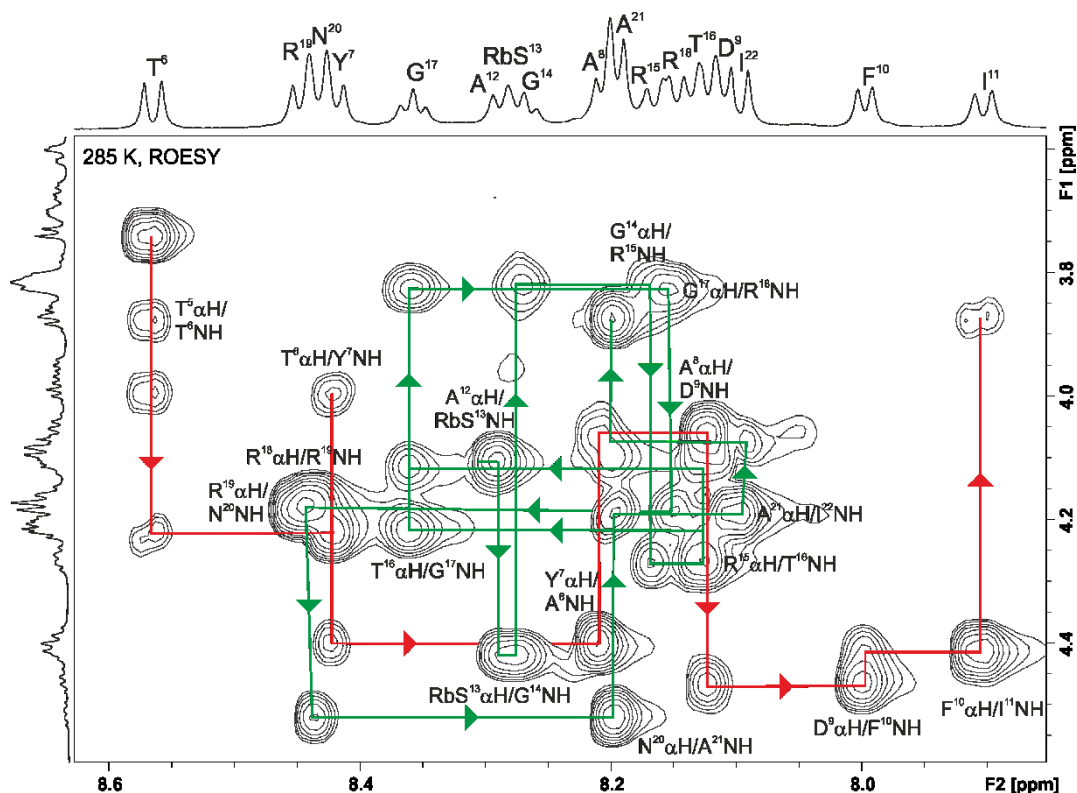


Abbildung 66. Sequential walk für das Peptid PKI(RbS¹⁸)⁵⁻²² **P28** zur vollständigen Zuordnung der Protonen und der richtigen Reihenfolge der Aminosäuren im Peptid anhand der α H/NH Spin-Spin-Kopplung im ROESY-Spektrum (600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/D₂O 9:1).

Wie in Abbildung 66 zu sehen ist, konnte der *sequential walk* beinahe vollständig durchgeführt werden. Lediglich der ROE-Kontakt zwischen dem Ile¹¹-NH und dem Ala¹²- α H konnte nicht ermittelt werden, sodass der *sequential walk* an dieser Stelle unterbrochen und mit einer anderen

Farbe fortgeführt wurde. In rot ist daher der *N*-terminale Bereich von Thr⁵-Ile¹¹ gezeigt und in grün die übrigen Aminosäuren Ala¹²-Ile²². Die Auswertung aller weiteren PKI-Peptide erfolgte analog zur beispielhaft gezeigten Sequenz des PKI(RbS¹⁸)⁵⁻²² **P28**.

3.3.1 Strategien für die Positionierung der RAS im Peptid

Für die Entwicklung neuer Wirkstoffe kommen, unter dem Gesichtspunkt der Inhibition des katalytischen Zyklus von Proteinkinasen, mehrere Angriffsstellen in Frage. Der in Abbildung 67 dargestellte, allgemeine katalytische Zyklus einer Substrat Phosphorylierung von Proteinkinasen, weist vier potentielle Inhibitionsstellen auf: die beiden ersten Schritte - die ATP Anbindung und die Substratbindung und die beiden darauf folgenden Schritte, im Zuge der Phosphorylierung - der Phosphat-Transfer und die Substratfreisetzung.^[197]

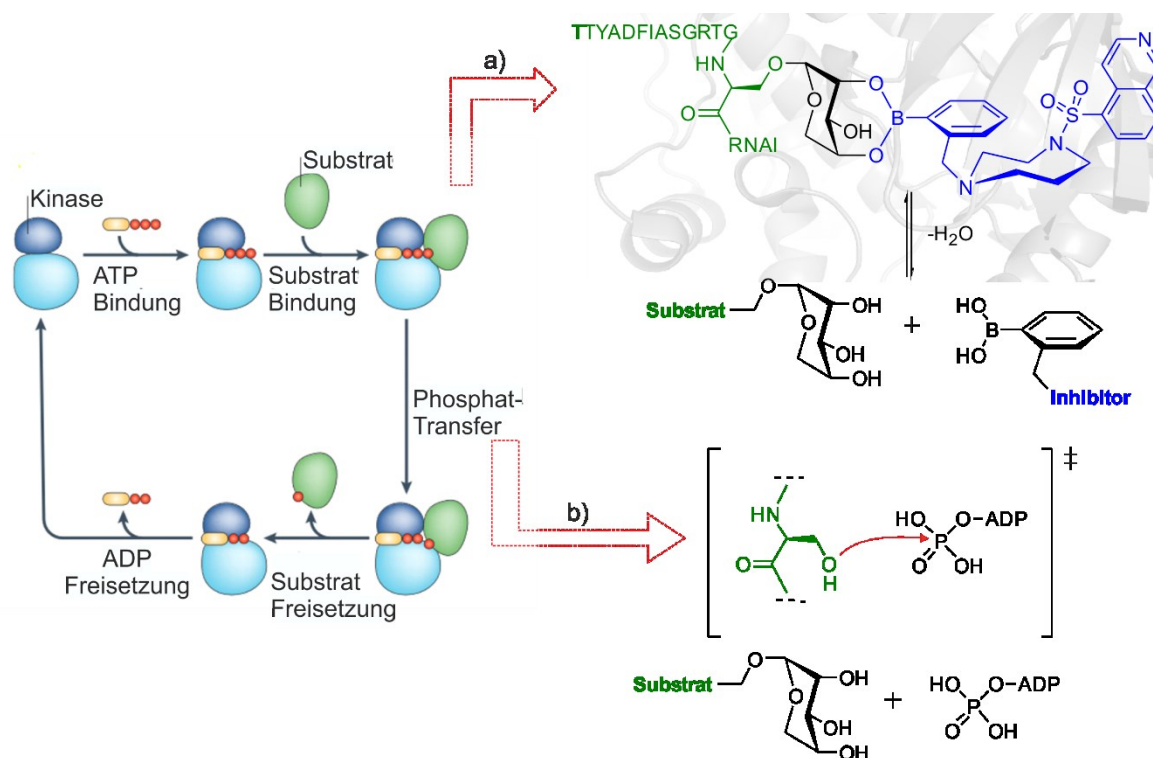


Abbildung 67. Darstellung beider, in dieser Arbeit betrachteter Ansätze ausgehend vom generellen katalytischen Zyklus der Substrat Phosphorylierung durch Proteinkinase A (siehe auch Abb. 15).^[197] Ansatz a) nimmt Bezug auf den Schritt der Substrat Bindung und wird in diesem Fall zur Verknüpfung des Substrats mit dem Inhibitor über Boronsäureveresterung genutzt. Im zweiten Ansatz b) soll der Phosphat Transfer nicht auf das Serin des Substrats erfolgen, sondern auf den Ribopyranosyl-Rest der modifizierten Substrat-Sequenz.

In dieser Arbeit wurden zwei mögliche Ansätze verfolgt, wobei der erste dem Ziel galt, die Phosphorylierung zu unterbinden, indem die ATP Bindungsstelle des Enzyms durch einen, an

das Substrat gebundenen, Inhibitor besetzt wurde. Der neue Inhibitor wurde dem bereits bekannten Inhibitor Fasudil® nachempfunden, indem das Isochinolinsulfonamid-Gerüst durch eine Boronsäure-Verknüpfung erweitert wurde. Die Boronsäure wiederum ermöglichte die Anbindung an die, mit RbS modifizierte, Peptidsequenz über eine Veresterungsreaktion, sodass ein Bisubstrat-Inhibitor geschaffen wurde. Der zweite Ansatz sah ein Eingreifen am Punkt der Phosphatübertragung vor, indem das zu phosphorylierende Serin in der Substrat-Sequenz gegen ein Riboserin ausgetauscht wurde. Im Zuge dessen sollte auch die Phosphorylierungstendenz der Zucker-Hydroxygruppen beobachtet werden. Gegebenenfalls sollte auf die Verwendung von ADP als Phosphat-Überträger zurückgegriffen werden, da der RbS-Rest im Vergleich zu Serin deutlich größer ist, was schematisch in Abbildung 68 zu sehen ist.

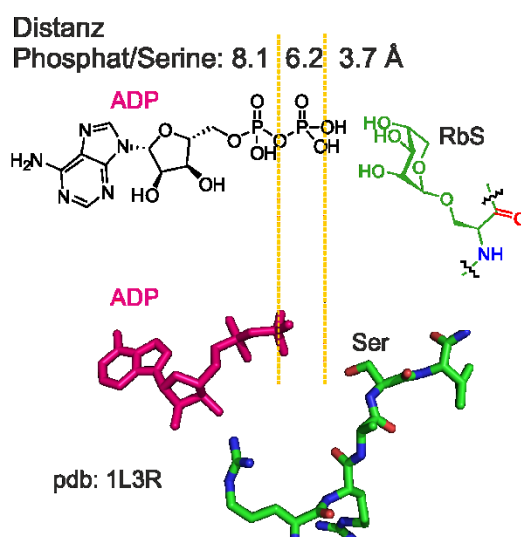


Abbildung 68. Darstellung einer möglichen Phosphat-Übertragung von ADP auf den RbS-Rest und die Messung des Abstandes zwischen ADP und dem Serin-Rest des Substrats aus der Kristallstruktur mit dem PDB-Code 1L3R.^[193]

Der generelle Fokus dieser Arbeit liegt jedoch auf dem ersten Ansatz, da das Verhindern der Phosphat-Übertragung nicht nur durch das Einbringen des Riboserins an Position 21 erreicht werden kann, sondern auch durch einige andere Modifikationen möglich wäre.^[212-215] Somit wurde mit Hilfe von vorhandenen Kristallstrukturen aus der PDB-Datenbank nach einer geeigneten Position für die Modifizierung des Inhibitors bzw. der Substrat-Sequenz gesucht.^[193,199,203] Das wichtigste Kriterium für die Positionierung der RAS war in diesem Fall der Abstand zum Inhibitor Fasudil®, da dieser kovalent reversibel über die Verknüpfung zwischen Zucker und Boronsäure gebunden werden sollte. Abbildung 69 zeigt einen Ausschnitt zweier übereinandergelegter Kristallstrukturen, die letztlich für die Positionierung ausschlag-

gebend war, sowie einen Strukturvorschlag für den geplanten Bisubstrat-Inhibitor, welcher mit Hilfe des Programms *HyperChem*® berechnet wurde.

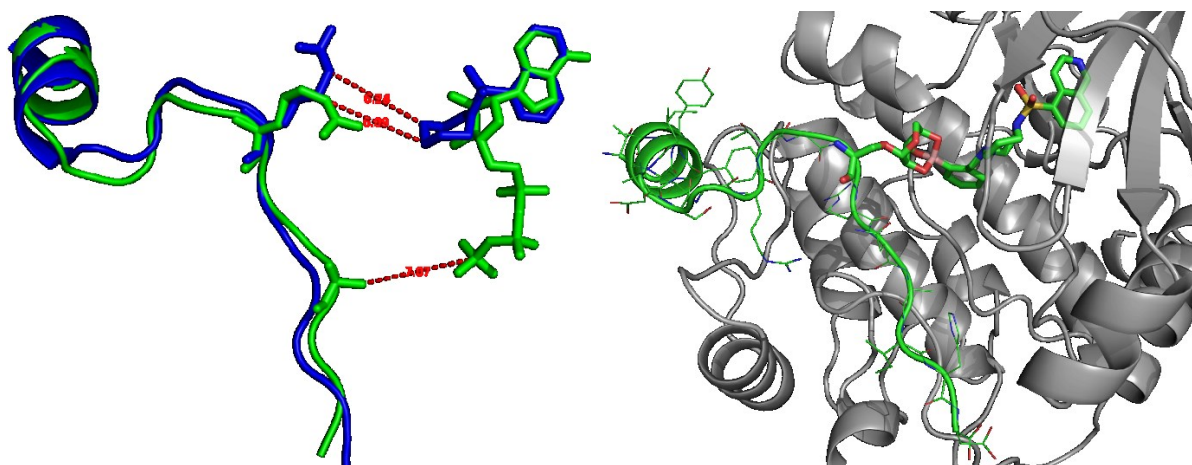


Abbildung 69. Links: Vergleich zwischen der Substrat-Sequenz mit ATP (grün, PDB-Code: 1ATP)^[199] und der Inhibitor-Sequenz mit Fasudil® (blau, PDB-Code: 1Q8W)^[203] als Ausschnitt aus den entsprechenden Kristallstrukturen mit PKA. Der Arginin-Rest an Position 18 weist den geringsten Abstand mit etwa 6 Å zum Homopiperazin-Ring des Fasudils® auf. Der Alanin-Rest (Position 21) der Inhibitor-Sequenz ist etwa 7 Å vom terminalen Phosphat-Rest des ATPs entfernt. Rechts: Mit *HyperChem*® berechnete Struktur der modifizierten Inhibitor-Sequenz mit RbS statt Arg¹⁸ und Fasudil-Anbindung über Boronsäureveresterung. In grau ist die Protein-Umgebung dargestellt.

Mittels dieser gezeigten Vergleiche und Betrachtungen der Kristallstrukturen wurden somit die Positionen des Arg¹⁸ und des Ala²¹ als besonders interessant für das Einbringen von RAS Bausteinen eingestuft und den entsprechenden, synthetisierten Peptiden wurden bei den Kristallisationsansätzen in der pharmazeutischen Chemie besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Im Laufe der Untersuchungen der Kristallstrukturen wurde eine weitere Position aufgegriffen, an der die Aminosäureseitenkette ebenfalls in die Richtung des Inhibitors zeigt. Dabei handelt es sich um das Asparagin an Position 20, welches im Zuge dessen ebenfalls gegen RbS mutiert wurde.

3.4 Synthese der Fasudil®-Derivate

Bei der Synthese neuer Bisubstrat-Inhibitoren wurde die Struktur des Fasudils® aufgegriffen, welches bereits seit 1995 für die Behandlung von zerebralem Vasospasmus eingesetzt wird und weitere klinische Phasen anderer Krankheiten durchlaufen hat.^[203] Zunächst wurden deshalb zu Testzwecken einige Fasudil-Precursor (**11**, **12**) synthetisiert, welche über ihr primäres Amin mit der Aldehyd-Funktion der 2-Formylphenylboronsäure in einer Iminierungs-Reaktion verknüpft werden sollten (Abb. 70).

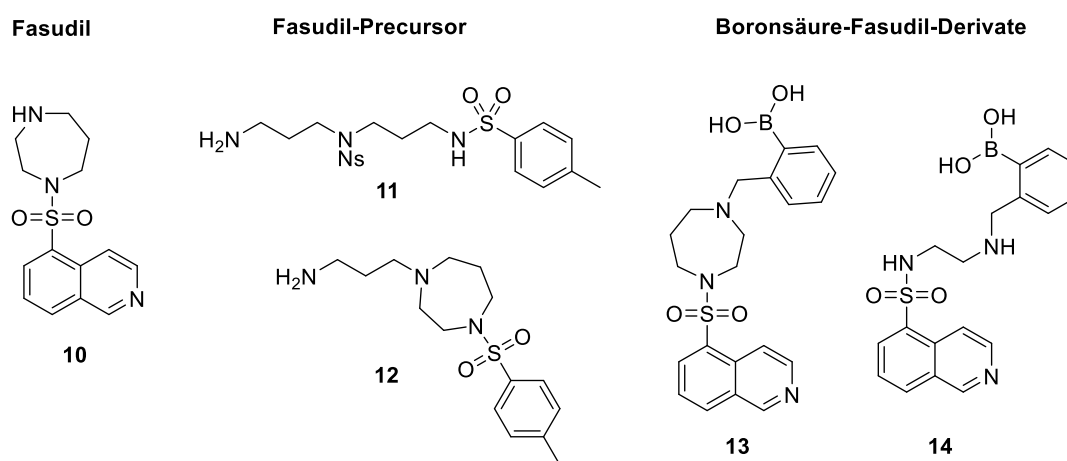


Abbildung 70. Darstellung verschiedener Fasudil-ähnlicher Verbindungen.

Diese Fasudil-Precursor wurden in einer 4-Komponenten-Reaktion im NMR Maßstab mit der 2-Formylphenylboronsäure, einem RAS-enthaltenden Testpeptid und Triethylamin vereint und mehrfach NMR-spektroskopisch vermessen. Dafür wurden die einzelnen Komponenten jeweils in äquimolaren Mengen eingesetzt und in 0.6 mL DMSO_{d6} gelöst. Bei dieser Reaktion waren zwei unterschiedliche Bindungsbildungen von Nöten, um das gewünschte Produkt zu erhalten. Zum einen die Iminierung, welche durch die basischen Bedingungen im NMR-Röhrchen eingeleitet werden sollte und zum anderen die Veresterung des Zuckers mit der Boronsäure. Beide Reaktionen lassen sich generell NMR-spektroskopisch sehr gut nachverfolgen, da das anomere Proton im Zuge der Veresterung eine Tieffeld Verschiebung erfährt und der Aldehyd Peak der Boronsäure dem Imin-Peak weicht, dies konnten jedoch im Falle des Testsystems nur unvollständig beobachtet werden (Abb. 71).

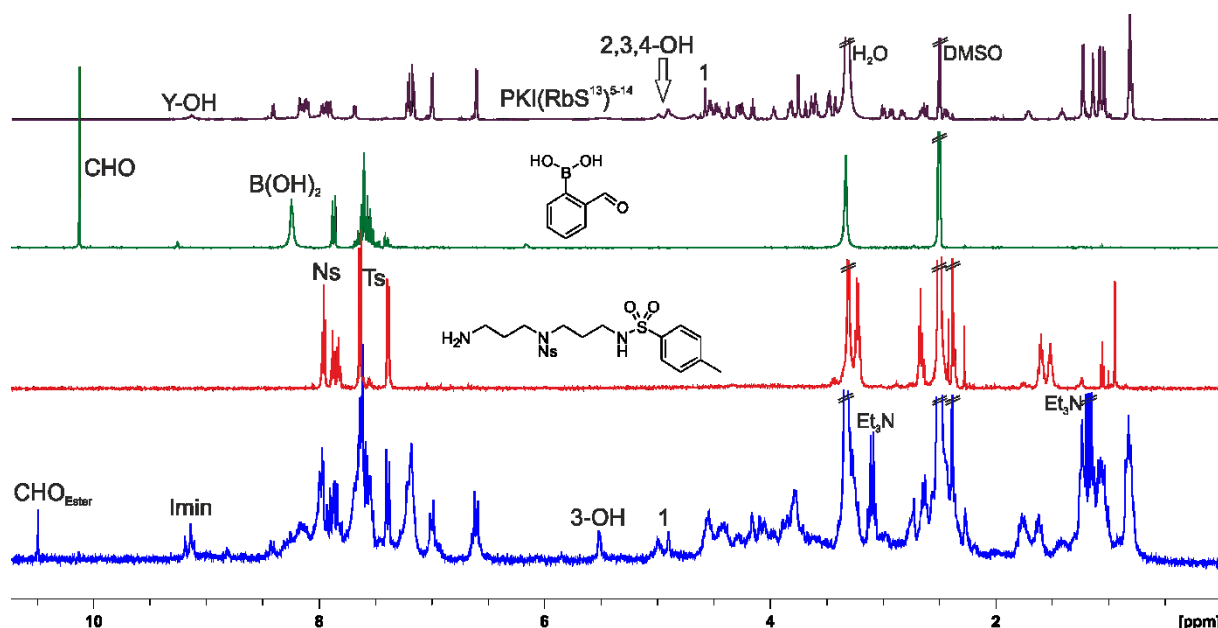
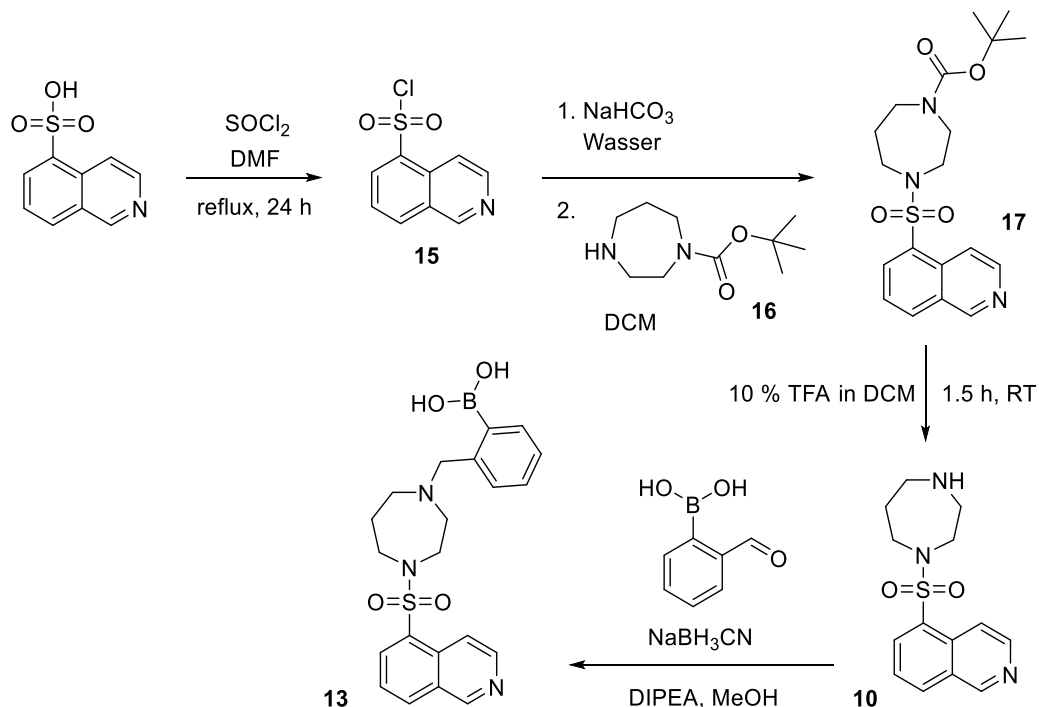


Abbildung 71. Gegenüberstellung der ^1H -NMR-Spektren (300 MHz, 300 K, DMSO-d_6) der einzelnen Komponenten des 4-Komponenten Systems (obere drei Spektren) mit dem Produkt-Spektrum (blau, unten). Das mit „1“ markierte anomere Proton ist im Produkt-Spektrum Tieffeld verschoben, was auf eine erfolgte Veresterung hindeutet. Der Aldehyd-Peak der Boronsäure ist ebenfalls Tieffeld verschoben und das Integral verkleinert, außerdem tritt ein Imin-Peak bei etwa 9 ppm auf, wodurch auf eine teilweise Umsetzung der bereits veresterten Boronsäure zum Imin ausgegangen werden kann.

Da das beschriebene 4-Komponenten System ohnehin viele Fehlerquellen birgt (exakte Einwaage, Notwendigkeit der simultanen Veresterung/Iminierung), keine vollständige Umsetzung liefert und sich nicht in ein wässriges Milieu übertragen lässt, was letztendlich für die Übertragung in das peptidische System notwendig wäre, wurde ein neuer Ansatz gewählt, um die Verknüpfung zwischen dem Inhibitor, der Boronsäure und der Peptidsequenz zu ermöglichen. Über eine vorab durchgeführte Verknüpfung der 2-Formylphenylboronsäure mit einem Fasudil-Derivat mittels reduktiver Aminierung sollte das 4-Komponenten-System auf ein 2-Komponenten-System vereinfacht werden (Abb. 70, rechte Spalte - **13**, **14**). Somit musste lediglich die Veresterung im NMR-Röhrchen verfolgt werden, um eine erfolgreiche Verknüpfung detektieren zu können. Die Synthese des Isochinolinsulfonamids erfolgte zunächst anhand einer Vorschrift von VASDEV *et al.* nach welcher, ausgehend von Isochinolinsulfonsäure, eine Chlorierung mit einem Überschuss an Thionylchlorid durchgeführt wurde, um das entsprechende Sulfonylchlorid zu erhalten.^[275] Dieses wurde anschließend mit einem entsprechenden Amin zum Sulfonamid umgesetzt und von der Boc-Schutzgruppen durch Behandlung mit verdünnter TFA befreit. Zuletzt wurde eine reduktive Aminierung zwischen der Aldehyd-Funktion der Boronsäure und dem sekundären Amin des Sulfonamids durch Zugabe von Natriumcyanoborhydrid eingeleitet. Die beiden Fasudil-Derivate, welche im

Folgenden als „Borono-Fasudil“ bezeichnet werden, wurden jeweils mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt und konnten anschließend für verschiedene Titrations- sowie Kristallisationsansätze verwendet werden. Die Syntheserouten sind in Schema 9 und 10 aufgeführt.



Schema 9. Syntheseroute des „Borono-Fasudils“ erster Generation **13**.

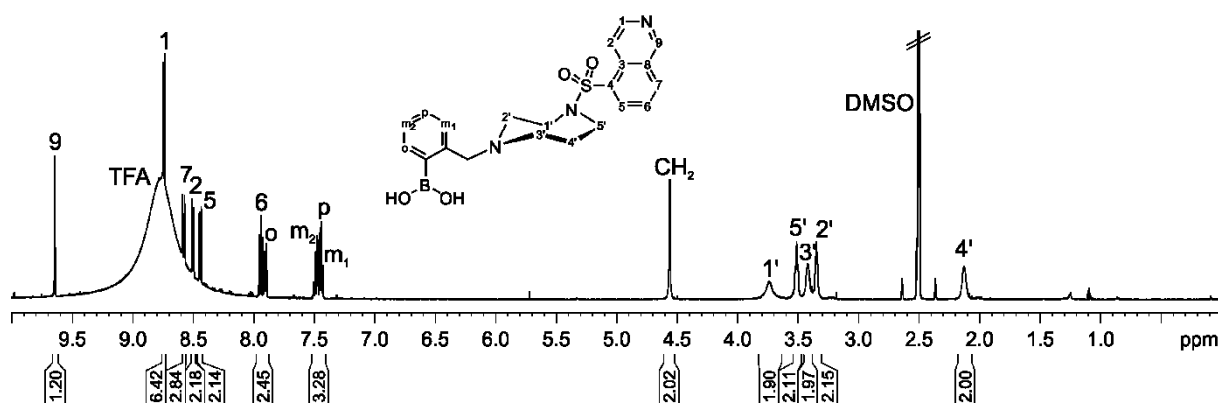
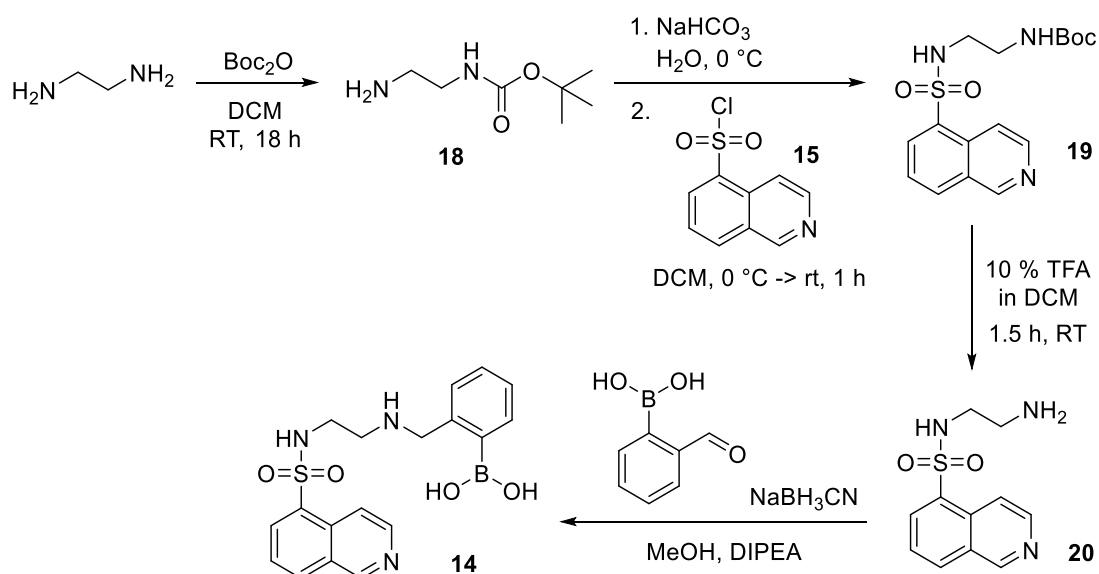


Abbildung 72. ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, 320 K, DMSO-d_6) des „Borono-Fasudils“ erster Generation **13**.



Schema 10. Syntheseroute des „Borono-Fasudils“ zweiter Generation **14**.

Eine Variation des Borono-Fasudils in erste und zweite Generation (**13**, **14**) wurde durchgeführt, um unterschiedliche Amin-Linker-Längen zwischen Sulfonamid und Boronsäure vorweisen zu können. Damit sollte, im Hinblick auf die Einführung des Bisubstrat-Inhibitors in das Protein, gegebenenfalls eine Regulierung des Abstands zwischen Inhibitor und Peptidsequenz ermöglicht werden. Zusätzlich wurde durch den offenkettigen Amin-Linker in der zweiten Generation des Borono-Fasudils mehr strukturelle Flexibilität geschaffen. Mit der verkürzten PKI-Sequenz $\text{PKI}(\text{RbS}^{13})^{5-14}$ **P19** wurde aus Gründen der vereinfachten Zuordnung gegenüber der vollständigen Sequenz eine Titration mit dem Borono-Fasudil der ersten Generation **13** durchgeführt, um die generelle Affinität der modifizierten Boronsäure gegenüber Diolen einschätzen zu können. Wie in allen Titrationsreihen zuvor, wurde auch dieses 2-Komponenten-System im NMR-Maßstab angesetzt und in 0.6 mL DMSO-d_6 gelöst. Die NMR-spektroskopische Vermessung erfolgte solange, bis sich das Gleichgewicht augenscheinlich vollständig zu Gunsten des Produkts eingestellt hatte. Aus der Zuordnung der Signal in Abbildung 73 kann geschlossen werden, dass die Affinität der modifizierten Boronsäure keine Beeinträchtigung durch den Fasudil Rest erfährt, da die erwarteten Signale einer vollständigen Veresterung im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum gefunden werden konnten.

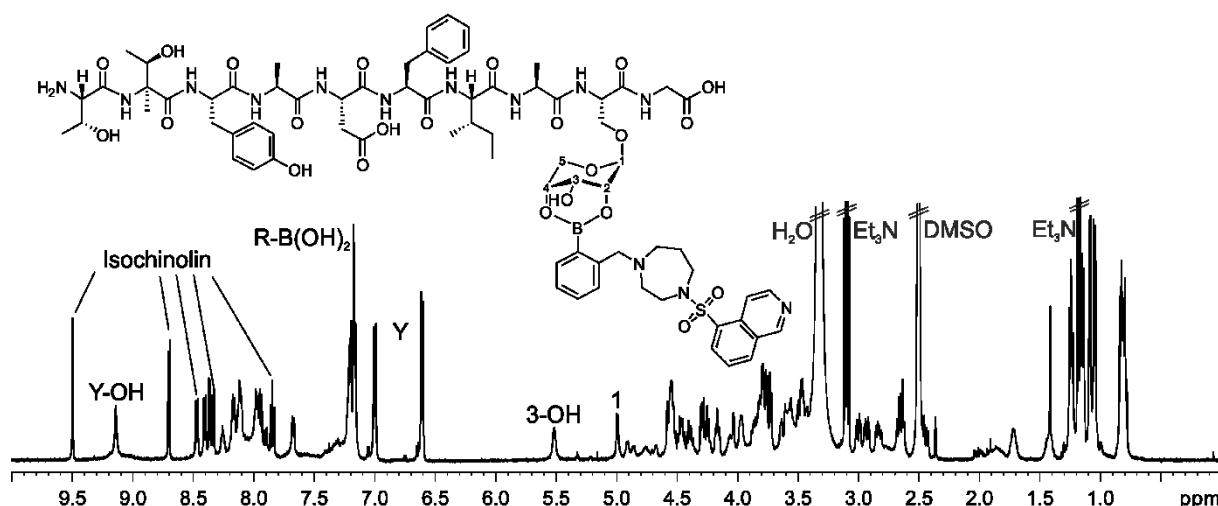


Abbildung 73. ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆) der Titration des Peptids PKI(RbS¹³)⁵⁻¹⁴ **P19** und dem Borono-Fasudil erster Generation **13**. Anhand der Tieffeld Verschiebung des anomeren Protons und der verkleinerten Kopplungskonstante lässt sich die Veresterung zwischen beiden Verbindungen bestätigen.

Im Zuge der Kristallisations-Versuche der PKI-Sequenzen mit dem Protein und den Fasudil-Derivaten in der pharmazeutischen Chemie im AK KLEBE konnten einige Kristalle zur Darstellung der Fasudil-Derivate erhalten werden. In der nachfolgenden Abbildung sind sowohl Fasudil **10** als auch das Borono-Fasudil erster Generation **13** aufgezeigt. Die dazugehörigen PDB-Codes sind der noch unveröffentlichten Dissertation von JANIS MÜLLER zu entnehmen.

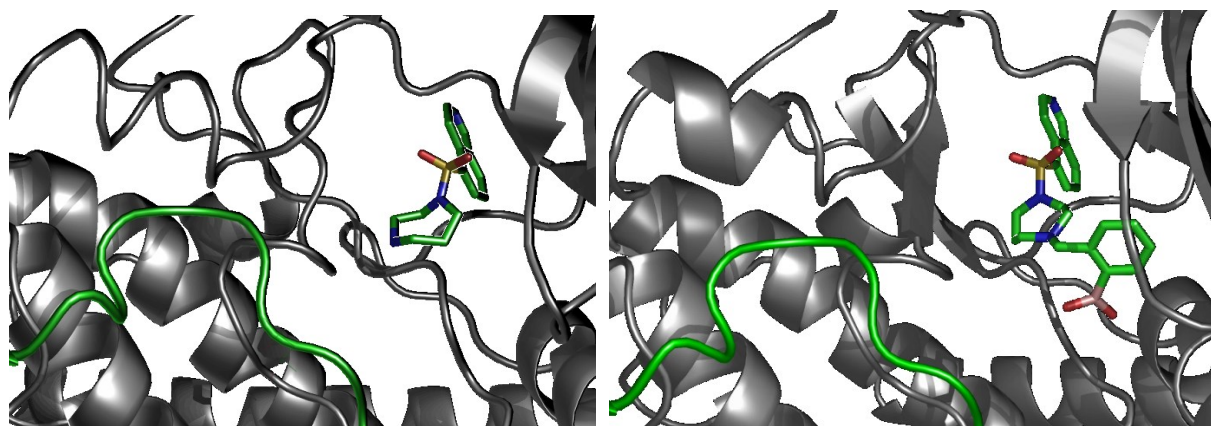


Abbildung 74. Darstellung des im Protein-Kristall befindlichen Fasudils® **10** (links) und des Borono-Fasudils **13** (rechts).

3.5 Ergebnisse aus der Kooperation mit der pharmazeutischen Chemie (AK KLEBE)

3.5.1 Kristallisationsansätze der modifizierten PKI-Sequenzen

Die Kristallisationsansätze mit den synthetisierten PKI-Sequenzen **P20-P31** wurden in der pharmazeutischen Chemie im Arbeitskreis KLEBE von JANIS MÜLLER durchgeführt. Sofern sich Kristalle der PKA mit den modifizierten PKI-Sequenzen gebildet haben, wurden diese mittels Röntgendiffraktometrie vermessen. Im Falle einer guten Auflösung $< 2.0 \text{ \AA}$ wurden die Kristalle zur Bestimmung der Kristallstruktur einer Vermessung am Synchrotron „*BESSY II*“ im Helmholtz Zentrum in Berlin unterzogen. In den meisten Fällen konnte die Struktur des RAS-Bausteins (trotz Auflösungen im Bereich von $1.5\text{-}2.0 \text{ \AA}$) nur bis zum verknüpfenden Seitenketten-Sauerstoff-Atom des Serins bzw. Threonins aufgelöst werden, da der Zucker-Rest offensichtlich im Kristall zu flexibel ist. Im Fall des PKI(RbS¹⁸)⁵⁻²² **P28** jedoch konnte der RbS-Baustein in der Arbeit von JANIS MÜLLER vollständig erfasst werden und ist in Abbildung 75 dargestellt.

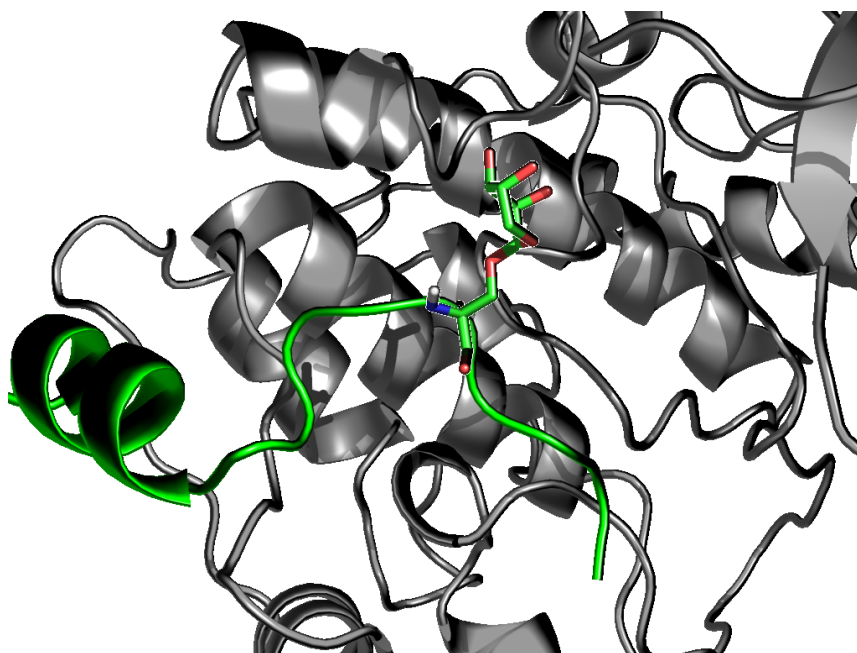


Abbildung 75. Ausschnitt aus dem Kristall des PKI(RbS¹⁸)⁵⁻²² **P28** in der PKA. Der RbS-Baustein an Position 18 ist hervorgehoben. Der PDB-Code der Kristallstruktur wird mit der Dissertation von JANIS MÜLLER veröffentlicht werden.

In einer weiteren Kristallstruktur (PDB-Code siehe Dissertation JANIS MÜLLER) konnte der Ribopyranosylrest des Serins bis einschließlich des Pyranose-Rings aufgelöst und damit zumindest eine grobe Einschätzung über die Orientierung des Zuckers in Richtung des

Inhibitors getroffen werden (Abb.76). Der RbS-Baustein befindet sich in diesem Fall an Position 21 der PKI-Sequenz (anstelle von Ala) und somit an der Stelle, an der im Substrat-Peptid die Phosphorylierung des Serins stattfinden würde.

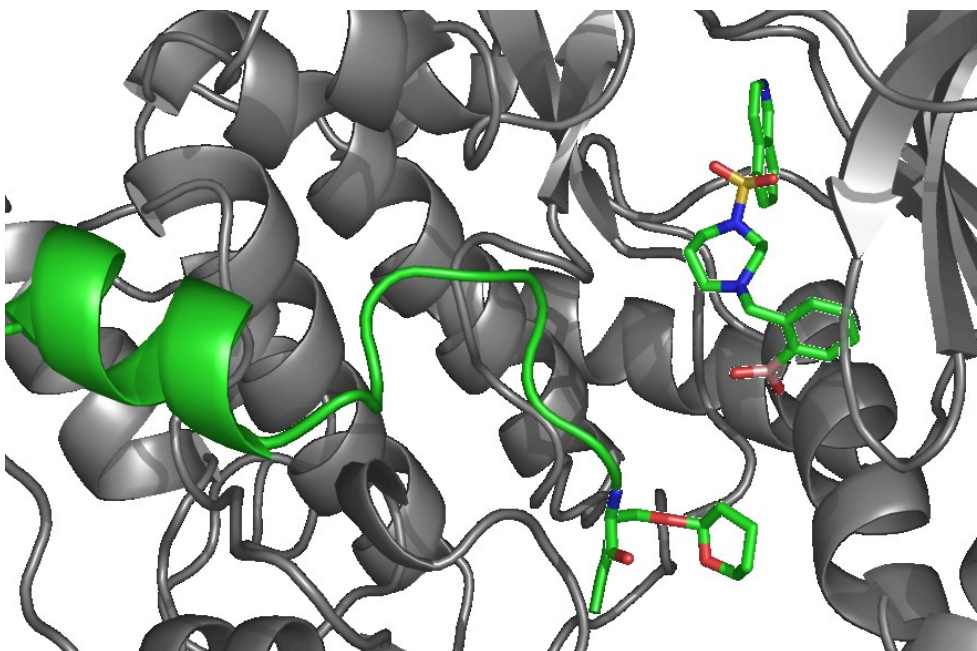


Abbildung 76. Ausschnitt aus dem Kristall des PKI(RbS²¹)⁵⁻²² **P31** in der PKA. Der RbS-Baustein an Position 21 und der Inhibitor sind hervorgehoben.

Die durchgeführten Kristallisationsversuche sowie die Affinitätsmessungen konnten bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig abgeschlossen werden, sodass noch einige Messwerte und Kristallstrukturen ausstehen. Die Beschreibungen der Kristallisationsbedingungen sowie eine detaillierte Beschreibung der Auswertung ist der noch unveröffentlichten Dissertation von JANIS MÜLLER vorbehalten und dieser zu entnehmen.

3.5.2 Methoden zur Affinitätsbestimmung

3.5.2.1 *Thermal Shift Assay*

Für die Bestimmung der Affinitäten der synthetisierten PKI-Peptide **P20-P31** wurden im AK KLEBE von JANIS MÜLLER sowohl *Thermal Shift Assays* (TSA), als auch Mikrothermophorese Assays mit der PKA durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen werden in dieser Arbeit nur zu Diskussionszwecken bereits vorzeitig aufgeführt, sind jedoch Gegenstand der noch unveröffentlichten Dissertation von JANIS MÜLLER, weshalb an dieser Stelle keine genaue

Erläuterung der Erfassung dieser Daten erfolgt, sondern lediglich eine kurze, generelle Beschreibung der verwendeten Methoden.

Beim *Thermal Shift Assay* (TSA) handelt es sich um eine relative günstige und einfach durchzuführende Methode, um niedermolekulare Verbindungen (Liganden) auf ihre Affinität zu Proteinen und ihre Stabilität in Puffern zu testen.^[279,280] Darüber hinaus können auch Aussagen über Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen getroffen werden.^[281] Dabei dient die Schmelztemperatur (T_m) des Proteins als Indiz für dessen Stabilität, da bei dieser Methode die temperaturabhängige Entfaltung des Proteins aufgezeichnet wird. Je höher die Thermostabilität des Proteins unter den gegebenen Bedingungen ist, desto höher ist auch dessen Schmelztemperatur. Verhilft nun die Bindung eines Liganden/Proteins/DNA an das Protein zur Stabilisierung der Faltung, so äußert sich dies in einem erhöhten T_m -Wert, da es erst bei höheren Temperaturen zur Denaturierung des Proteins kommt.^[281] Typischerweise erfolgt die Detektion der T_m -Änderung mittels Lichtstreuungs- oder Fluoreszenz-Messung, wofür zumeist ein fluoreszierender Proteinfarbstoff wie SYPRO Orange zum Einsatz kommt (Thermofluor Assay; Abb. 77).^[282] Aufgrund der relativ einfachen Durchführbarkeit des TSA Experiments, dient es auch als Screening-Methode für Peptid- und Wirkstoff-Bibliotheken^[283] und zur Optimierung von Kristallisationsbedingungen.^[284] In Abbildung 78 ist exemplarisch der Kurvenverlauf eines Thermofluor Assays gezeigt.

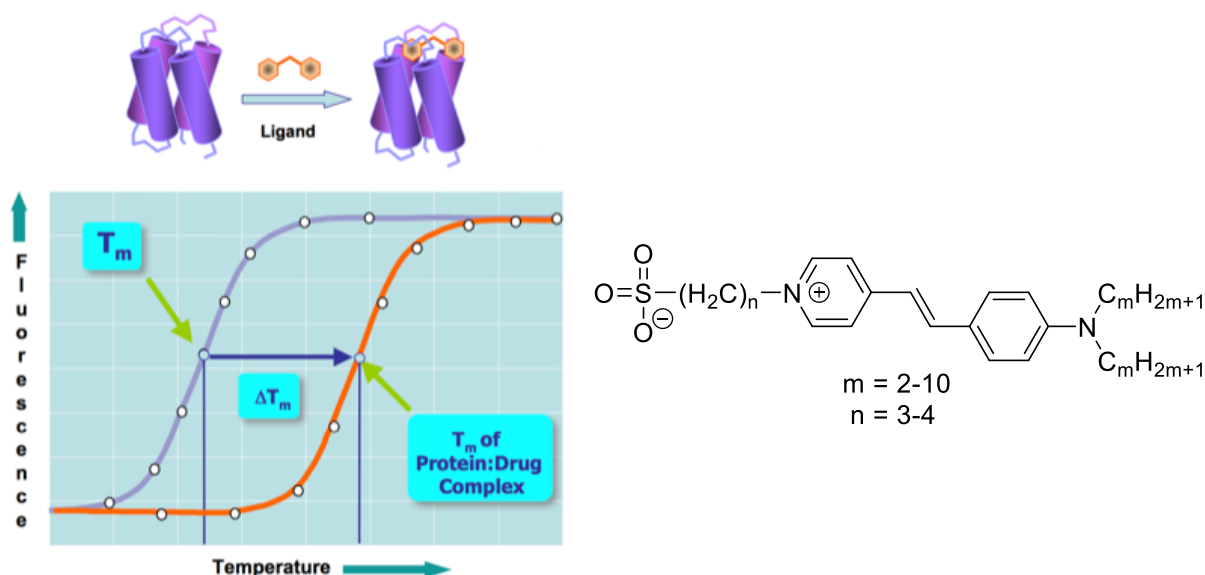


Abbildung 77. Links: Thermofluor Assay zur Detektion einer spezifischen Ligand-Bindung (Abb. von M. I. NELEN *et al.*).^[285] Mittels Fluoreszenz-Marker kann die T_m -Änderung verfolgt werden. Rechts: Sypro-Orange Marker.

3.5.2.2 Thermophorese Assay

Der Thermophorese Assay beruht auf der Detektion von Änderungen der Diffusionseigenschaften von Fluoreszenz-markierten Molekülen. Diese Änderungen resultieren aus den verschiedenen, unter den gegebenen Einflüssen vorliegenden Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen, welche alle unterschiedliche thermophoretische Bewegungen vorweisen. Über den gemessenen, strukturabhängigen Temperaturgradienten lassen sich Bindungsaffinitäten zwischen Proteinen und Liganden mit hoher Genauigkeit bestimmen.^[286] Mithilfe eines IR-Lasers erfolgt die Bestrahlung der Proben in speziellen Glaskapillaren und erzeugt einen mikroskalierten Temperaturgradienten, anhand dessen die Moleküle in der Probe diffundieren.^[287] Nach Ausschalten des Lasers erfolgt die Rückdiffusion und eine Thermophorese Kurve kann aufgezeichnet werden. Dabei dient ein Fluoreszenz-Marker der genauen Detektion der Fluoreszenz-Intensität der wandernden, markierten Moleküle. Weitere Faktoren, die eine Änderung der thermophoretischen Eigenschaften hervorrufen, sind Änderungen des Molekulargewichts, der elektrischen Ladung und der Solvationseigenschaften. Ein großer Vorteil dieser Messmethode ist die hohe Sensibilität und die Tatsache, dass es sich um eine optische Methode handelt, die eine Kontaminierung der Proben verhindert.^[288,289] Der schematische Aufbau sowie eine typische Messkurve sind in Abbildung 78 gezeigt.

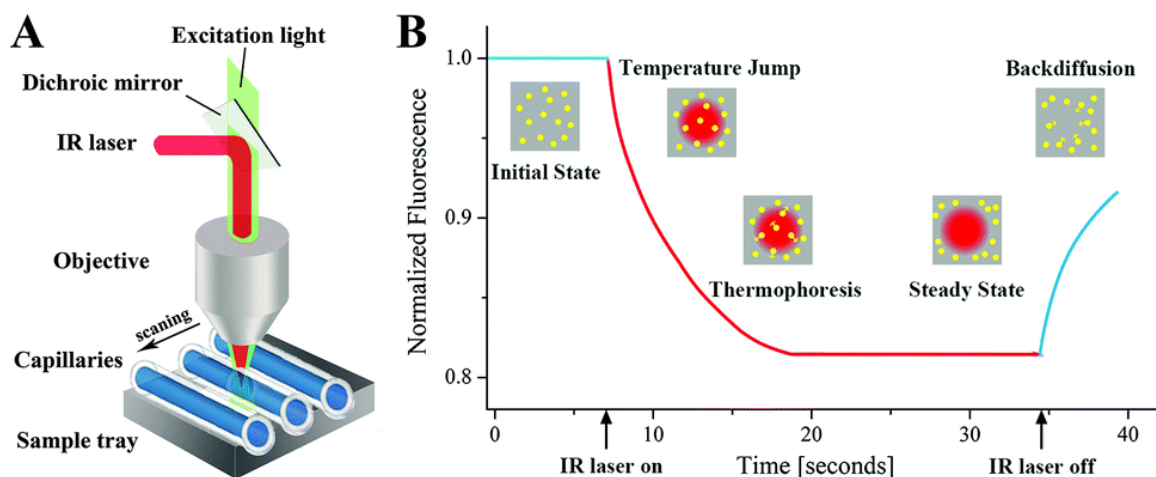


Abbildung 78. A) Schematischer Aufbau der *Microscale* Thermophorese Apparatur.^[290] Mittels eines IR-Lasers wird die Probelösung in der Kapillare erhitzt, wodurch ein induzierter Temperaturgradient Anlass zur Diffusion gibt. Über eine Fluoreszenz-Detektion der zuvor markierten Proteinmoleküle wird deren räumliche Diffusion erfasst. Durch das Objektiv wird diese gemessen und das Thermophorese-Signal bei unterschiedlichen Konzentrationen und in Abhängigkeit des Temperaturgradienten im zeitlichen Verlauf aufgezeichnet. B) Darstellung einer typischen Thermophorese Assay Kurve.^[290] Ohne IR-Laserstrahlung befindet sich das Protein im Grundzustand. Durch Einschalten des IR-Lasers kommt es zu einem Temperatursprung, welcher die Thermophorese des Fluoreszenz-markierten Proteins aus dem bestrahlten Bereich einleitet. Nach Ausschalten des IR-Lasers setzt die Rückdiffusion ein.

Die Mikrothermophorese Assays wurden ebenfalls in der pharmazeutischen Chemie im Arbeitskreis KLEBE von JANIS MÜLLER durchgeführt. Dafür wurden die verschiedenen PKI Peptide jeweils in Messreihen mit und ohne ATP Zugabe (5 mM) vermessen, jedoch war die Affinitäts-Bestimmung ohne Zugabe von ATP in den meisten Fällen nicht möglich. Die von JANIS MÜLLER gemessenen K_D -Werte aus den Thermophorese Assays sowie die ΔT -Werte aus den TSA sind in Tabelle 9 zusammengefasst und dienen hier lediglich der Diskussion des Einflusses der verschiedenen RAS-Mutationen an unterschiedlichen Positionen in den PKI-Sequenzen. Die gezeigten Ergebnisse sind jedoch Gegenstand der noch unveröffentlichten Dissertation von JANIS MÜLLER und werden dort ordnungsgemäß publiziert.

Tabelle 9. Auflistung der K_D - und ΔT -Werte aus den Thermophorese Assays bzw. TSA für die verschiedenen PKI Sequenzen, gemessen im AK KLEBE von JANIS MÜLLER. Die Messreihen wurden jeweils mit und ohne ATP-Zugabe durchgeführt. „Nicht messbar“ bedeutet, dass keine aussagekräftigen Werte erhalten wurden.

| PKI-Sequenz | Affinität (K_D) | ΔT in TSA | Affinität (K_D) | ΔT in TSA |
|---|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| | 0 mM ATP | 50 nM Peptid 0 mM ATP | 5 mM ATP | 20 nM Peptid 5 mM ATP |
| PKI ⁵⁻²⁴ | Nicht messbar | 1.17 ± 0.24 °C | 144 ± 30 nM | 6.50 ± 0.24 °C |
| PKI ⁵⁻²² | Nicht messbar | 0.50 ± 0.29 °C | 4.32 ± 0.89 μ M | 3.50 ± 0.00 °C |
| PKI(RbS ¹³) ⁵⁻²² P25 | Nicht messbar | 0.17 ± 0.29 °C | 2.67 ± 0.35 μ M | 2.50 ± 0.29 °C |
| PKI(RbT ¹⁶) ⁵⁻²² P26 | Nicht messbar | 0.67 ± 0.00 °C | 25.96 ± 4.65 μ M | 1.83 ± 0.29 °C |
| PKI(RbS ¹⁷) ⁵⁻²² P27 | Nicht messbar | Nicht messbar | 93.98 ± 82.59 μ M | Nicht messbar |
| PKI(RbS ¹⁸) ⁵⁻²² P28 | Nicht messbar | 0.00 ± 0.00 °C | > 400 μ M | 0.17 ± 0.29 °C |
| PKI(RbS ¹⁹) ⁵⁻²² P29 | Nicht messbar | Nicht messbar | Nicht messbar | Nicht messbar |
| PKI(RbS ²⁰) ⁵⁻²² P30 | 6.20 ± 5.00 μ M | 1.00 ± 0.00 °C | 29.60 ± 10.00 μ M | 2.33 ± 0.29 °C |
| PKI(RbS ²¹) ⁵⁻²² P31 | 21.9 ± 8.04 μ M | Nicht messbar | Nicht messbar | Nicht messbar |

Aus den Thermophorese und *Thermal shift assays* können einige Informationen über die chemisch-modifizierten PKI Sequenzen erhalten werden. Zum einen wird ersichtlich, dass der Einbau von Riboserin- bzw. Ribothreonin-Bausteinen nicht generell zu einem großen Verlust der Bindungsaffinität gegenüber dem Protein führt, sondern eher von der Position der Mutation abhängig ist. So ist bereits literaturbekannt, dass der Austausch der Arginine zu hohen Einbußen der K_D -Werte führt, was letztlich auch beim Einbau der RAS-Bausteine beobachtet wurde.^[191,283] Auch bei Mutationen im Bereich der ATP-Bindetasche war mit etwas geringeren Affinitäts-Werten zu rechnen, was sich ebenfalls in den Messreihen bestätigte. Der Einsatz der synthetisierten Fasudil-Derivate anstelle des ATPs führte nur zu moderatem Verlust der Affinität. Die von JANIS MÜLLER erhaltenen Werte für diese Messreihe sind in Tabelle 10 zu finden.

Tabelle 10. Ergebnisse der im AK KLEBE von JANIS MÜLLER gemessenen Thermophorese Assays mit den Fasudil-Inhibitoren anstelle des ATPs. Ebenfalls enthalten sind die ΔT -Werte des TSA (rechte Spalte).

| Inhibitor | Affinität (K_D) | ΔT in TSA, 100 nM Ligand |
|---------------------------|-----------------------------|--|
| Fasudil® (10) | $1.58 \pm 1.79 \mu\text{M}$ | $7.83 \pm 0.00 \text{ }^\circ\text{C}$ |
| 1. Generation (13) | $5.86 \pm 2.75 \mu\text{M}$ | $3.67 \pm 0.29 \text{ }^\circ\text{C}$ |
| 2. Generation (14) | $7.61 \pm 6.25 \mu\text{M}$ | $3.33 \pm 0.00 \text{ }^\circ\text{C}$ |

Eine genauere Erläuterung der verwendeten Messmethoden und Ergebnisse aus der Kooperation mit dem AK KLEBE kann der entsprechenden, zu diesem Zeitpunkt noch unveröffentlichten Dissertation von JANIS MÜLLER entnommen werden.

3.5.3 Einbau der Adamantyl-Aminosäuren in die PKI-Sequenz

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe HRDINA der Justus-Liebig-Universität Gießen wurden Diamantoid-Bausteine (der einfachste Vertreter - Adamantan) synthetisiert^[291] und in peptidische Systeme eingebaut. Die Synthese der Adamantyl-Bausteine erfolgte dabei im Arbeitskreis HRDINA, währenddessen wurden strukturbasierte Molekulardynamik-Simulationen (MD-Simulation) in der pharmazeutischen Chemie der Arbeitsgruppe KLEBE durchgeführt, um innerhalb der PKI-Sequenz möglichst günstige Positionen für den Einbau der

Adamantyl-Aminosäuren zu finden. Dabei wurde von der Bindungsgeometrie des PKI-Peptids in der Kristallstruktur der PKA ausgegangen. Anschließend erfolgte der Einbau der jeweiligen modifizierten Aminosäuren in die PKI-Sequenz mittels Peptidsynthesizer, wobei die aus den Strukturbetrachtungen erhaltene Prioritäten-Liste zugrunde gelegt wurde. Danach wurden die Rohpeptide mittels HPLC aufgereinigt und eine NMR-spektroskopische Aufklärung der Struktur durchgeführt.

Die aus Gießen zur Verfügung gestellten Adamantyl-Aminosäuren sind in Abbildung 79 aufgeführt. Vier dieser Bausteine wurden in sieben verschiedene PKI-Sequenzen eingebaut (obere Reihe + (S)SC3). Davon konnten fünf Peptide analytisch rein erhalten und NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Weiterhin wurden diese fünf Peptide an JANIS MÜLLER in der pharmazeutischen Chemie übergeben, wo sie Kristallisationsansätzen mit dem PKA-Protein unterzogen wurden.

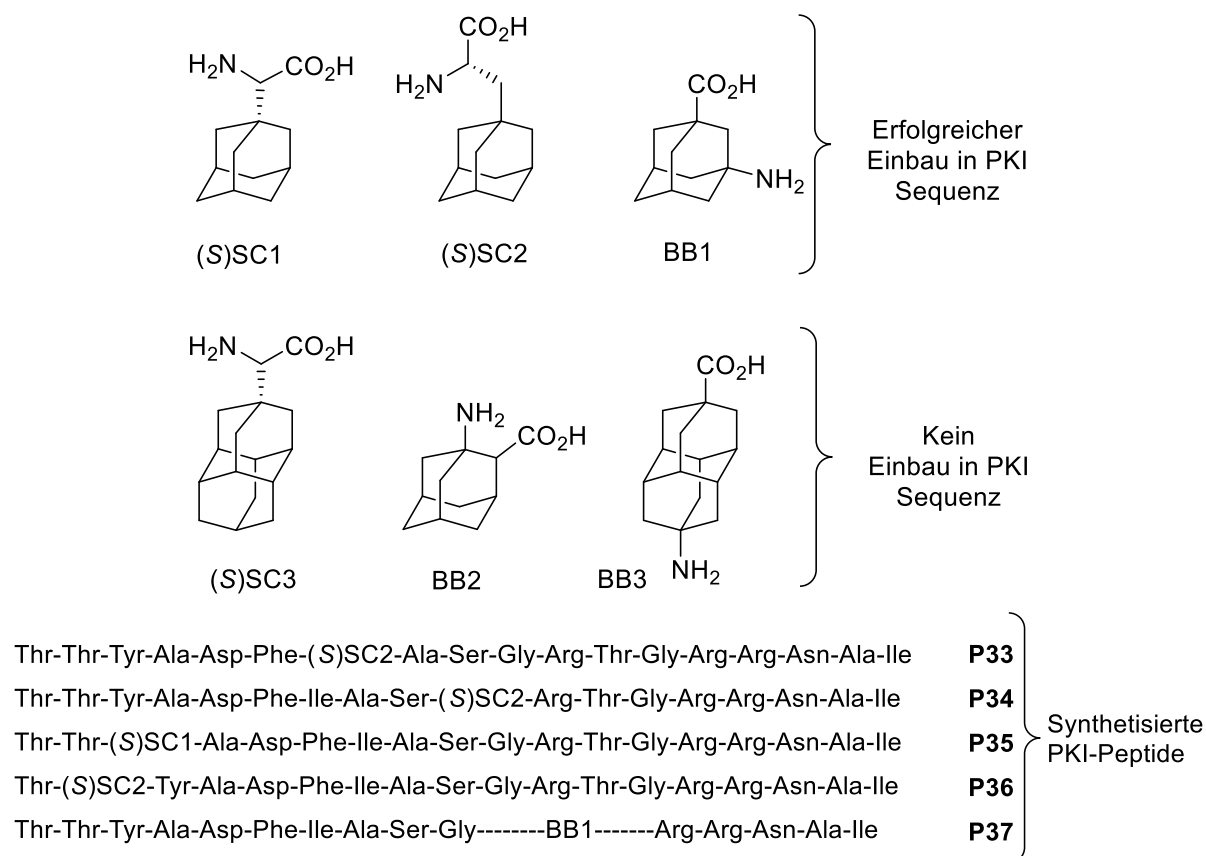


Abbildung 79. Übersicht der potentiell einzubauenden Adamantyl-Bausteine und die damit synthetisierten PKI-Sequenzen **P33-P37**.

Alle mittels HPLC aufgereinigten Peptide wurden in Phosphatpuffer bei pH 3 vermessen und unter Zuhilfenahme von 2D-Spektren vollständig zugeordnet. Beispielfhaft ist nachfolgend das ^1H -NMR-Spektrum der PKI-Sequenz mit BB1 abgebildet.

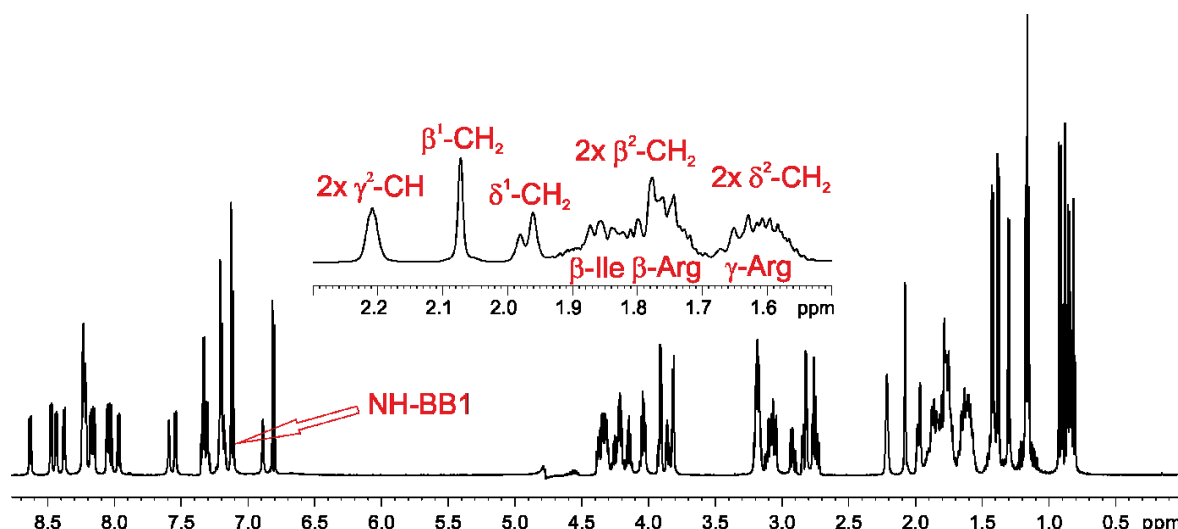


Abbildung 80. ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/ D_2O 9:1) des BB1-enthaltenden PKI-Peptids **P37**. Die Signale des Adamantyl-Bausteins sind in rot hervorgehoben und der aliphatische Bereich ist vergrößert dargestellt.

Die Kristallisationsansätze, die in der pharmazeutischen Chemie im AK KLEBE (von JANIS MÜLLER) mit den synthetisierten PKI-Sequenzen mit Adamantyl-Mutation unternommen wurden, lieferten einen messbaren Kristall mit dem Protein. Darin enthalten ist das Peptid **P36**, welches den Adamantyl-Baustein (*S*)-SC2 anstelle des Threonins an Position 6 trägt. Eine Interpretation der erhaltenen Kristallstruktur ist der bisher noch unveröffentlichten Dissertation von JANIS MÜLLER zu entnehmen. Auch in diesem Fall wurden von JANIS MÜLLER Untersuchungen mittels TSA und Thermophorese Assay durchgeführt, um die Affinität der Peptide zum Protein bestimmen zu können (Tabelle 11). Dabei ergab sich für das Peptid **P33** sogar ein höherer Affinitäts-Wert als für die native PKI⁵⁻²² Sequenz. Eine genauere Erläuterung und Interpretation dieser Ergebnisse ist den (noch unveröffentlichten) Dissertationen von JANIS MÜLLER (AK KLEBE) und JAN-PHILIPP BERNDT (AK HRDINA) vorbehalten.

Tabelle 11 Ergebnisse des Thermophorese Assays mit einigen Adamantyl-PKI-Sequenzen, gemessen mit und ohne ATP. Für PKI **P33** wurde ein viermal höherer Wert erhalten als für die native Sequenz.

| PKI-Sequenz | Affinität (K_D) ohne ATP | Affinität (K_D) mit 5 mM ATP |
|---|------------------------------|----------------------------------|
| PKI(SC2 ¹¹) ⁵⁻²² P33 | $1.16 \pm 0.40 \mu\text{M}$ | $657 \pm 143 \text{ nM}$ |
| PKI(SC1 ⁷) ⁵⁻²² P35 | Nicht messbar | $3.14 \pm 0.88 \mu\text{M}$ |
| PKI(BB1 ¹⁵⁻¹⁷) ⁵⁻²² P37 | Nicht messbar | $50.0 \pm 8.30 \mu\text{M}$ |

3.6 Weitere RAS-enhaltende Peptide

Die im Arbeitskreis GEYER bereits eingehend bearbeiteten Peptidsequenzen des Filaggrins^[292] und des Foldon β -hairpins^[312] wurden im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls an geeigneten Stellen mit den RAS-Bausteinen versehen und auf die Toleranz gegenüber diesen Mutationen untersucht. Beide Strukturen weisen eine *hairpin*-Konformation auf, wodurch charakteristische Verschiebungen in den NMR-Spektren erhalten werden, die anhand von Verschiebungsänderungen sehr gut nachvollzogen werden können. Abbildung 81 zeigt die Mutationen, die jeweils sowohl in der Filaggrin-Sequenz (oben), als auch im β -hairpin des Foldons (unten) vorgenommen wurden.

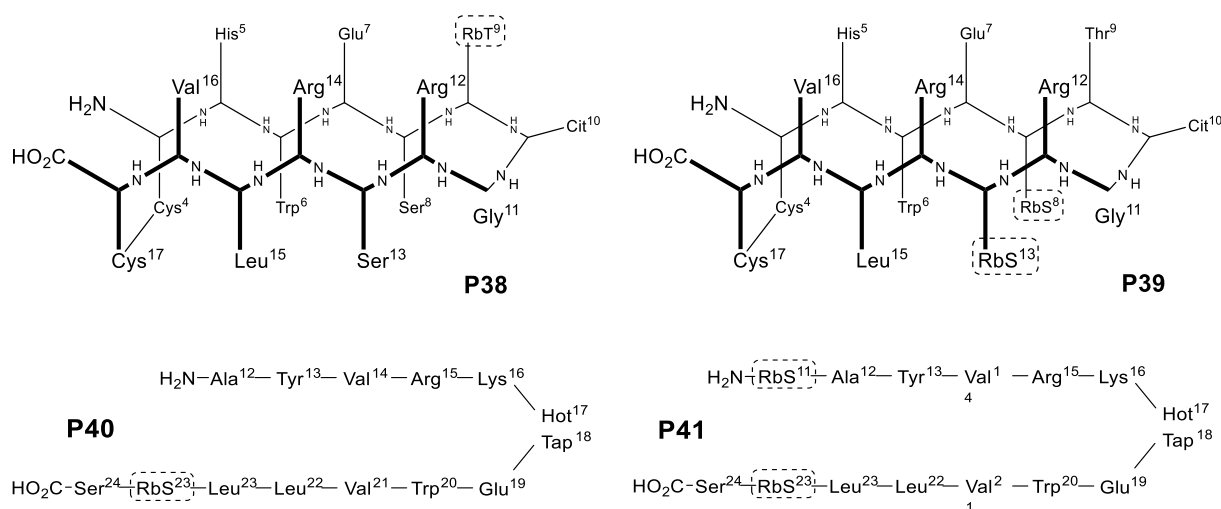


Abbildung 81. Schematische Darstellung der synthetisierten Filaggrin-Peptide (**P38**, **P39**, oben) und der β -hairpin Peptide des Foldons (**P40**, **P41**, unten) mit Markierungen der entsprechenden Mutationen.

Die Handhabung der RAS-Bausteine am Peptidsynthesizer wurde bereits im Vorfeld an anderen Sequenzen getestet und stellte keine Probleme dar. Der Einbau in die β -hairpin-Sequenzen lieferte daher nach HPLC-Aufreinigung saubere Peptide (**P40**, **P41**) in guten Ausbeuten. Die ¹H-NMR-Spektren der mutierten β -hairpin Peptide sind in Abbildung 82 dargestellt.

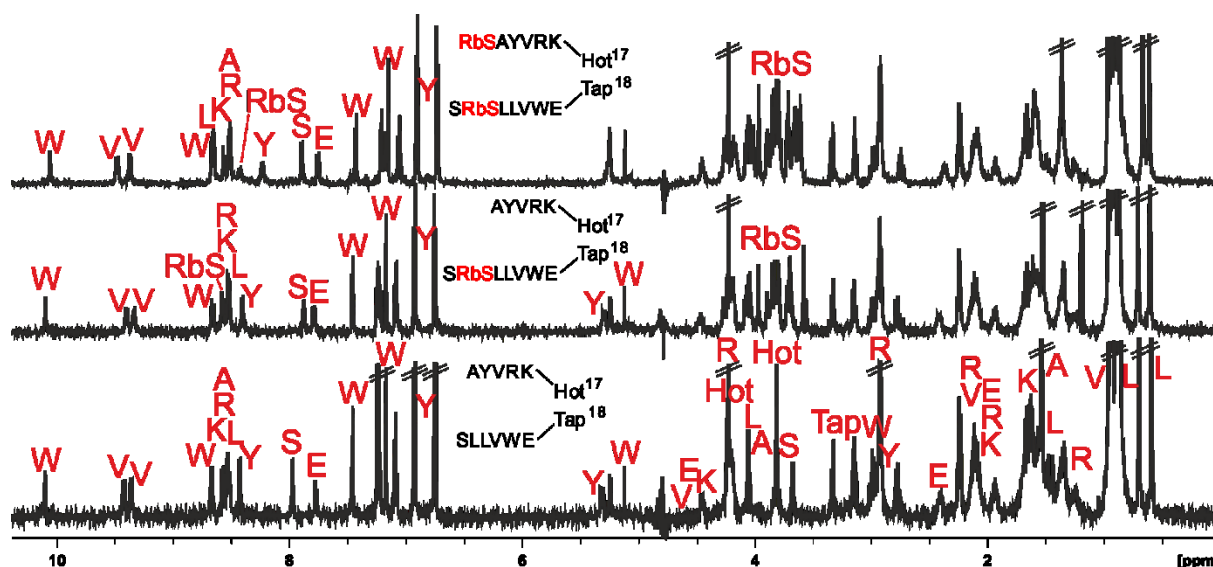


Abbildung 82. Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/D $_2\text{O}$ 9:1) der β -*hairpin* Peptide des Foldons mit keiner (unten), mit einer (**P40**, Mitte) und mit zwei (**P41**, oben) RbS-Mutationen.

Aus den gezeigten Spektren ist klar ersichtlich, dass die RbS-Mutationen keine grundlegenden Änderungen der Konformation nach sich ziehen. Der β -*hairpin* bleibt bestehen, was die Verschiebungen im NH-Bereich und der Leucin-Signale im Hochfeld klar belegen. Bis auf die hinzukommenden RbS-Signale ähneln die Spektren sehr stark dem der Hot=Tap-modifizierten nativen Sequenz, weshalb von einer hohen Toleranz der Sequenz gegenüber RAS-Bausteinen am C- bzw. N-Terminus ausgegangen wird. Da hier jedoch Aminosäure Positionen für die Mutation gewählt wurden, die nicht für die *hairpin*-Konformation essentiell sind, könnten die Experimente zukünftig dahingehend ausgeweitet werden.

Die Synthese der Filaggrin-Peptide (**P38**, **P39**) dagegen beinhaltete deutlich mehr Schwierigkeiten. Bereits nach der Peptidsynthese zeigten sich im HPLC-Elugramm sehr viele Spezies. Aus diesem Grund konnten auch bei der Aufreinigung mittels HPLC nur sehr geringe Ausbeuten erzielt werden. Jedoch konnte genug sauberes Peptid gewonnen werden, um dieses NMR-spektroskopisch zu vermessen und einem biologischen Test zur Bestimmung der Affinität gegenüber Autoantikörpern, die bei rheumatoider Arthritis (RA) auftreten, zu unterziehen. Diese biologischen Tests wurden von ANDREAS SCHRIMPF durchgeführt. Es handelt sich dabei um einen indirekten ELISA-Test (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), der auf der Erkennung der an die Mikrotiterplatte gebundenen Peptid-Antigene durch sogeannte ACPAs (*Anti-Citrullinated Peptide/Protein Antibody*) basiert.^[292] Solche ACPAs finden sich bereits in einem frühen Krankheitsstadium im Blutserum der Patienten wieder, sodass diese der Früherkennung der RA-Erkrankung dienen können.^[292] Mittels ELISA-Test kann über die

Höhe der gemessenen Absorption, eine Aussage über die Affinität des jeweiligen Peptids getroffen werden, wobei zur besseren Vergleichbarkeit ein Peptid mit bekannter Antikörperaktivität herangezogen wird.^[293] Zusätzlich kann mithilfe von Dot Blot-Tests über eine Farbreaktion, die bei Anbindung der citrullinierten Filaggrin-Sequenz an die ACPA Antikörper hervorgerufen wird, die Affinität der synthetisierten Peptide gegenüber den ACPAs eingestuft werden. Im Fall der glykosylierten Filaggrin-Peptide wurden jedoch lediglich ELISA-Tests durchgeführt und die erhaltenen Daten mit bereits optimierten Filaggrin-Sequenzen verglichen. Somit konnte eine ungefähre Einstufung der Affinitäten der RAS-modifizierten Filaggrin-Peptide erfolgen. Anhand der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass sowohl die Mutation der beiden Serine gegen den RbS-Baustein als auch der Austausch des Threonins gegen RbT nicht zum Verlust der Affinität führt. Da die beiden Serine im Filaggrin nicht in das oberseitig liegende Wasserstoffbrückennetzwerk involviert sind (siehe Abb. 81), haben die RbS-Mutationen an diesen beiden Positionen vermutlich keinen Einfluss auf die Konformation bzw. auf die Epitop-Erkennung, sodass die Affinität gegenüber der ACPAs erhalten bleibt. Das Threonin dagegen befindet sich innerhalb des Wasserstoffbrückennetzwerks der Filaggrin-Sequenz und darüber hinaus in unmittelbarer Nähe zu dem Citrullin, welches für die Erkennung durch die ACPAs essentiell ist. Tatsächlich schlägt sich die RbT-Mutation in einer Affinitätsverringerung nieder, jedoch kommt es nicht zum vollständigen Verlust, wohingegen die RbS-Mutation lediglich eine leichte Verringerung der Affinität zur Folge hat. Generell gibt es zwar keinen Zusammenhang zwischen der Strukturstabilität und den Mutationen in Wasserstoffbrücken-gebundenen Positionen, jedoch scheint die unmittelbare Nähe der RbT-Mutation im Filaggrin-Peptid **P38** zum Citrullin einen Einfluss auf dessen Affinität zu haben. Somit könnte durch weitere RAS-Mutationen der positionsabhängige Einfluss im Filaggrin-Peptid untersucht werden.

3.6.1 Einbau von 3-Carboxyphenylboronsäure in Peptidseitenketten zur Anbindung RAS-enthaltender Peptide

Die bisherigen Ansätze beruhten alle auf dem Einbau von RAS-Bauteinen in Peptide, um dort Anknüpfungspunkte für eine Boronsäureveresterung einzubringen. Die umgekehrte Vorgehensweise ist jedoch auch denkbar und einige durchgeführte, darauf basierende Experimente sollen daher in diesem Kapitel aufgezeigt werden. Als Ausgangsverbindung für die Veresterung von Boronsäure-enthaltenden Peptiden mit verschiedenen Diolen diente ein Heptapeptid **P42** mit einem modifizierten Lysin, dessen Seitenketten-Amin mit der Carboxyfunktion der 3-

Carboxyphenylboronsäure (3CB) gekuppelt wurde (Abkürzung des Lysin-Derivats: BLy). Die Peptidsequenz entstammt dabei dem katalytisch aktiven Teil des PKI-Peptids, welches in einer weiteren Versuchsreihe nochmals als vollständige Sequenz mit der gleichen Lysin-Modifikation verwendet wurde. Zunächst wurde die Veresterung zu Testzwecken mit ungeschützter D-Ribose durchgeführt, um die generelle Veresterungstendenz abschätzen zu können. Anschließend wurden die Ribofuranose in Form von Adenosin als Diol eingesetzt und zuletzt ein kurzes, RbS-enhaltendes Peptid verwendet (Abbildung 83).

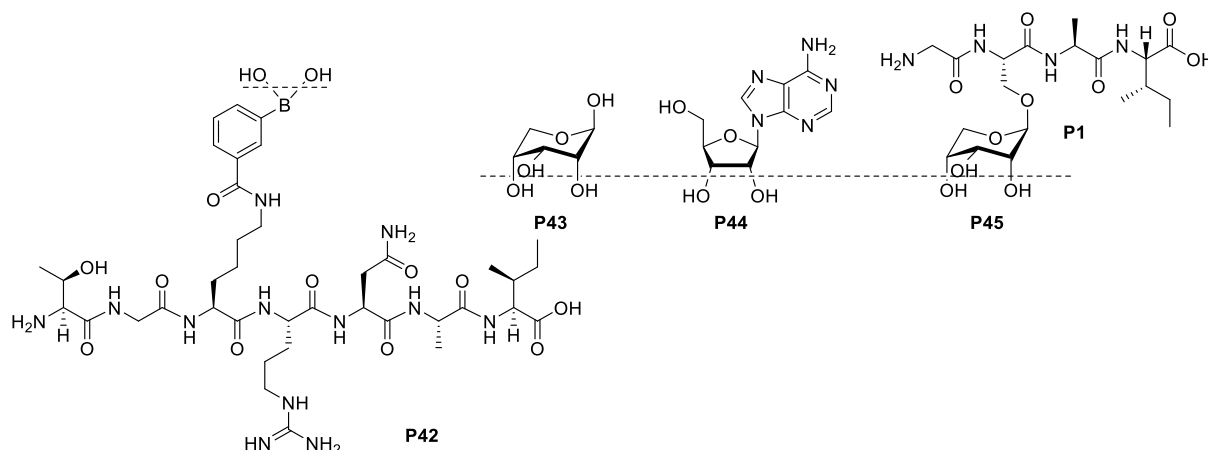


Abbildung 83. Testsequenz für die Kupplung von 3CB am Harz. Anschließend wurden verschiedene Diole für die Veresterung mit der Boronsäure getestet.

Jedes, zur Veresterung eingesetzte Diol, wurde in einem ^1H -NMR Experiment in DMSO-d_6 eingesetzt und mittels 2D Spektren erfolgte die genaue Zuordnung der Signale. In allen Spektren konnte durch den Vergleich mit den Edukt Spektren und das Beobachten der charakteristischen Signale, eine Umsetzung der Boronsäure mit dem entsprechenden Diol festgestellt werden. Im Falle des Adenosins findet jedoch keine vollständige Veresterung statt, da noch ein zweiter Signalsatz des ungebundenen Adenosins vorhanden ist, obwohl noch freie Boronsäure zur Veresterung zur Verfügung stünde. Das Tetrapeptid **P1** dagegen weist eine vollständige Umsetzung auf, da keine Signal für das ungebundene anomere Proton mehr im Spektrum zu sehen ist (Abbildung 84).

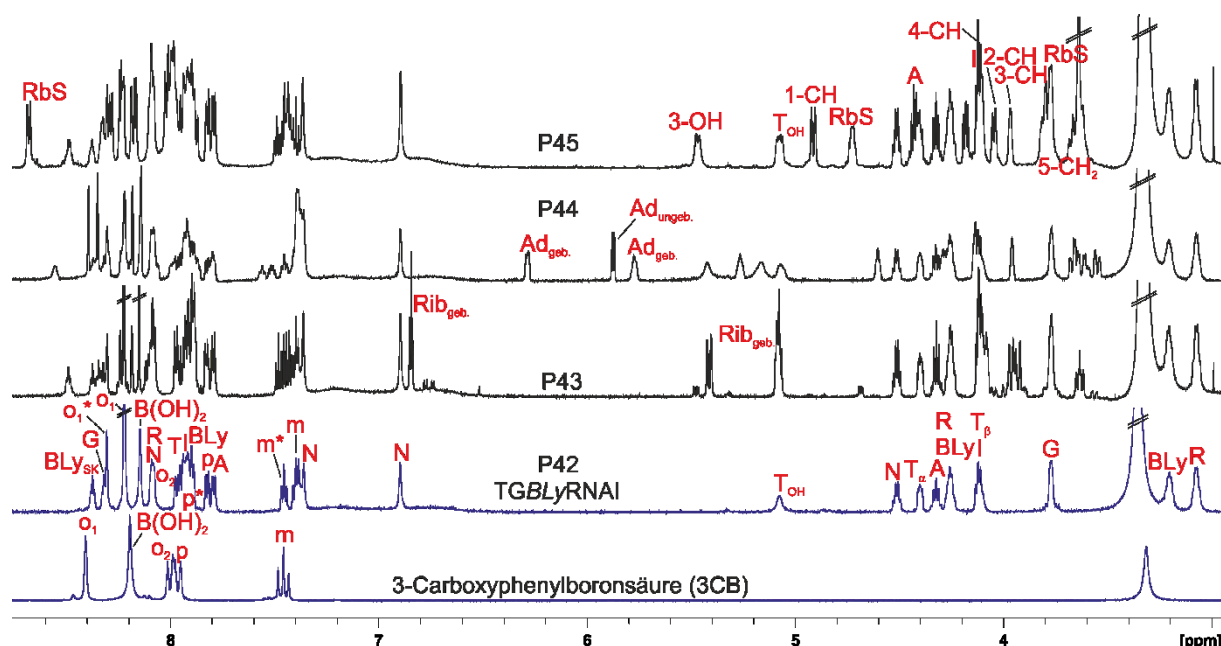


Abbildung 84. Übersicht der Veresterungen im NMR-Maßstab (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6) des 3CB enthaltenden Peptids **P42** mit den verschiedenen Diolen. Die beiden unteren, blauen Spektren sind die jeweiligen Edukte (freie 3CB und das Heptapeptid **P42**), welche mit Ribose, Adenosin und einem RbS-enthaltenden Tetrapeptid **P1** umgesetzt werden. Die für die Veresterung charakteristischen Signale sind in den drei oberen Spektren rot markiert und tauchen in allen Ansätzen auf. Lediglich die Veresterung mit Adenosin findet nicht quantitativ statt, da noch Edukt-Peaks des Adenosins vorhanden sind.

Außerdem erfolgte ein 3CB-Einbau in die Seitenkette des Lysins im A β -Peptid des Prions **P46**. Dafür wurde die Aminosäuresequenz 28-40 mit dem Zusatz LysAhx(Lys)₄Ahx gewählt, welche bereits von DR. ANDREAS ROEDER in seiner Dissertation charakterisiert wurde.^[294] Die Modifikation wurde dabei am Lysin in Position 41 vorgenommen und erfolgte, wie bereits im Beispiel zuvor, während der Festphasenpeptidsynthese durch Verwendung des Seitenketten-Dde-geschützten Lysins an dieser Position. In diesem speziellen Beispiel eines bereits relativ langen Peptids (20 AS) sollte nun ein weiteres (großes) Peptid über die Boronsäure gebunden werden, um über diese Methode eine Verbrückung zweier Peptide zu ermöglichen. Zu Testzwecken wurde deshalb das Dekapeptid **P19** aus der PKI-Sequenz verwendet, welches an der vorletzten Position einen RbS-Baustein zur Anbindung an die Boronsäure trug. Das Experiment wurde erneut im NMR-Maßstab durchgeführt und anhand der charakteristischen Verschiebung des anomeren Protons und der 3-Hydroxygruppe ausgewertet (Abb. 85).

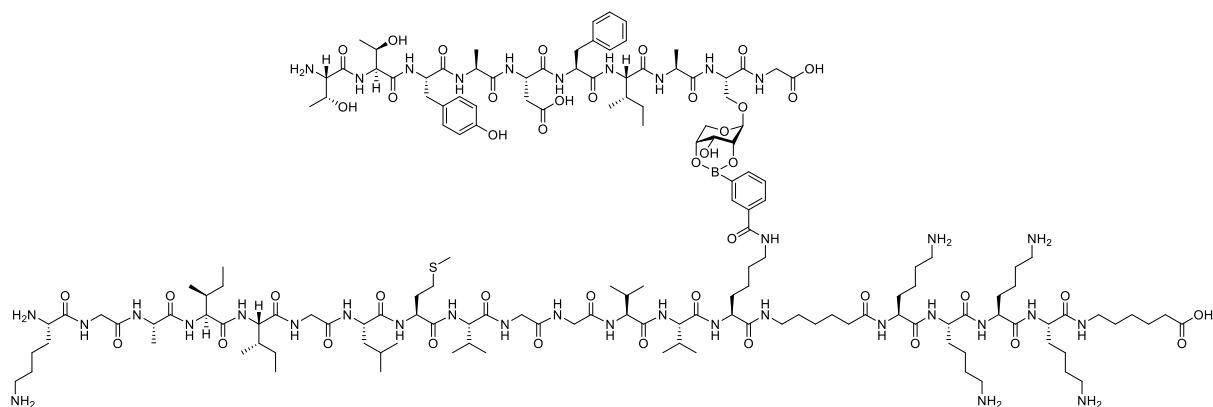


Abbildung 85. Darstellung der über Boronsäure und RbS-Baustein verknüpften Peptide. Mit Hilfe dieser Methode wäre es denkbar, große Peptide miteinander zu verknüpfen, um mit geringem Aufwand Peptide mit großem Molekulargewicht zu erhalten.

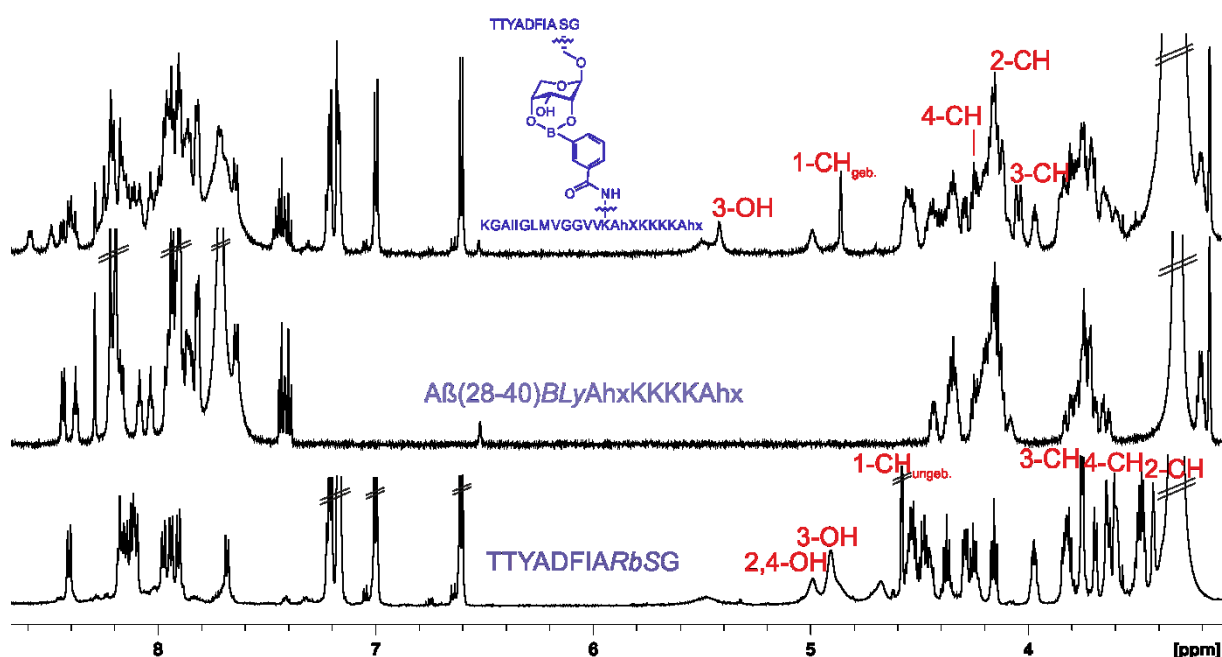


Abbildung 86. Verknüpfung zweier Peptide mittels Boronsäureveresterung. Ein Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K, DMSO-d_6) einer Prion-Sequenz **P46** ($\text{A}\beta(28-40)\text{BLYAhxKKAhKKAhK}$) mit Seitenketten modifiziertem Lysin (BLY) wurde über das Diol des RbS aus dem PKI-Ausschnitt **P19** an die Boronsäure gebunden. Die stattgefundenene Veresterung kann anhand der chemischen Verschiebung des anomeren Protons und der 3-OH Gruppe des Zuckers verifiziert werden und ist mit roter Beschriftung markiert.

Mit Hilfe der CH-Korrelation im HSQC-Spektrum wird ersichtlich, dass die Veresterung der Boronsäure des Peptids **P46** mit dem RbS-Baustein des Peptids **P19** nicht gänzlich vollständig abläuft. Zwar ist das Signal des ungebundenen anomeren Protons im ^1H -NMR-Spektrum aufgrund der hohen Signaldichte nicht mehr deutlich zu erkennen, jedoch ist im HSQC-Spektrum noch ein zweites Signal zu sehen (Abb. 87).

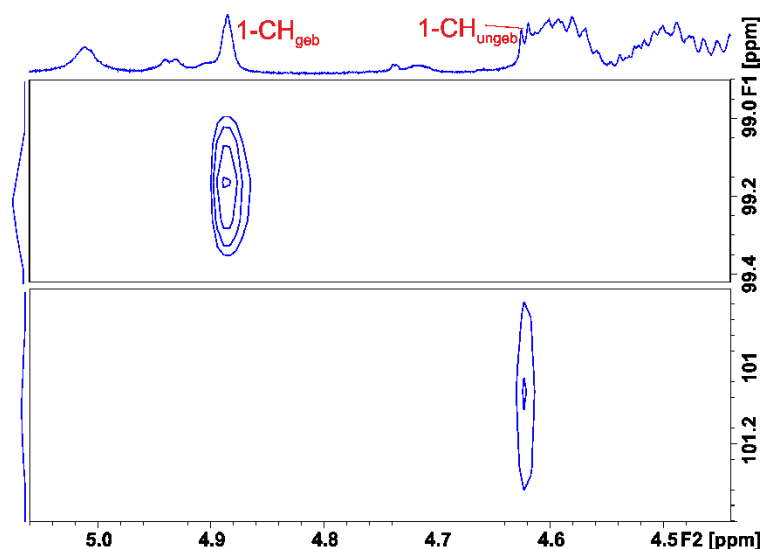


Abbildung 87. Ausschnitt aus dem HSQC Spektrum (600 MHz, 300 K, DMSO_{d6}) zum Nachweis der veresterten und der unveresterten Spezies durch Betrachtung des anomeren Protons. Das Vorliegen zweier Signale für das anomere Proton bei den dafür bekannten Verschiebungen beweist das Vorhandensein beider Spezies.

Dies kann entweder mit einer ungenauen Einwaage im nicht äquimolaren Verhältnis der beiden Peptide zueinander begründet werden, oder an einer, möglicherweise durch die Sterik, gehemmten Affinität der Komponenten zueinander. Aufgrund der hohen Signaldichte im Spektrum lässt sich jedoch schwer eine Aussage über eine möglicherweise ungenaue Einwaage treffen und eine Affinitätsbestimmung mittels NMR-Spektroskopie ist bei der Größe der verwendeten Peptide ebenfalls nicht durchführbar (kein Ablesen der $^3J_{1H,2H}$ -Kopplung möglich).

3.7 Natürlich vorkommende, glykosylierte Peptidsequenzen mit RAS-Mutation

Wie eingangs bereits erwähnt, bedient sich die Natur der Glykosylierung von Peptiden, um diesen weitere Funktionen, wie dem Schutz der Zelle oder Erkennungsmerkmale für andere Zellen, hinzuzufügen.^[4,6] Einige, in der Natur vorkommende Peptide, welche glykosylierte Aminosäuren beinhalten, sind z.B. Sublancin, Glycocin F, Mucin und Glycogenin (Abb. 88). Die beiden erstgenannten tragen ein *S*- bzw. ein *S*- und *O*-glykosyliertes Cystein bzw. Serin, Mucin enthält ein mit GalNAc glykosyliertes Threonin und Glycogenin weist einen Glucose-Rest am Tyrosin auf.^[295-297] Bei Sublancin und Glycocin F handelt es sich generell um glykosylierte antimikrobielle Peptide, deren Glykosylierung erst posttranslational erfolgt.^[298] Mucin gehört zur Klasse der Membranglykoproteine, welche in fast allen Epithelzell-Typen als

strukturegebender Bestandteil vorkommen.^[299] Die verschiedenen, kovalent gebundenen Polysaccharide in den Seitenketten des Serins und Threonins ermöglicht es den Mucinen Wasser zu binden und sorgt damit für die typische schleimartige Konsistenz, die wiederum die Adhäsion von Mikroorganismen verhindert. Das sogenannte MUC1 steht in Verdacht, bei Überexpression zu Tumorzellbildung zu führen und ist daher ein sehr interessanter Ansatzpunkt für die Immuntherapie und dient bereits seit den 90er Jahren als Tumormarker (Ca15.3).^[299-301]

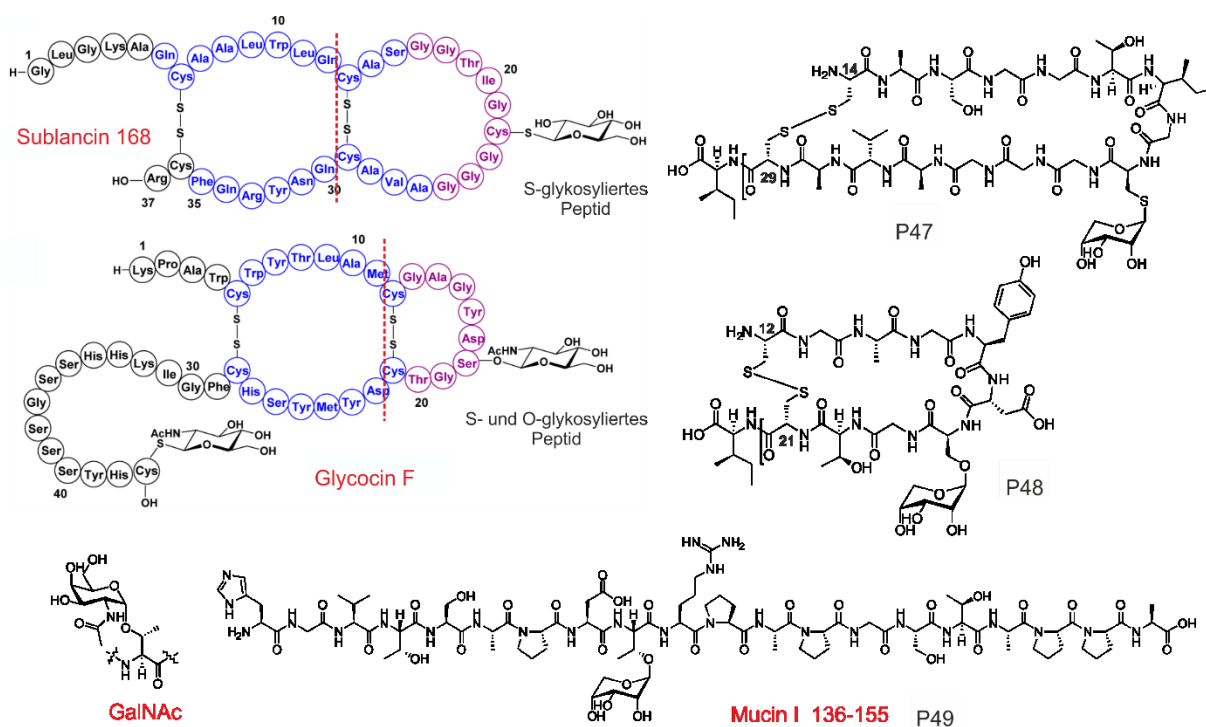


Abbildung 88. Darstellung einiger, natürlich vorkommender, glykosylierter Peptide.^[298] Links sind jeweils die nativen Sequenzen und deren Glykosylierungen gezeigt und rechts das entsprechende, synthetisierte Peptid (**P47-P49**). Die beiden Disulfide Sublancin **P47** und Glycocin **P48** wurden am Isoleucin-Harz aufgebaut.

Während die Glykosylierung in der Natur posttranslational stattfindet, erfolgte der Einbau in die Modell-Peptide durch Zugabe der entsprechenden, glykosylierten Bausteine während der Peptidsynthese am Synthesizer. Die Peptid-Ausschnitte des Sublancins **P47** und des Glycocins **P48** wurden im Anschluss an die Synthese zum Disulfid oxidiert und nach Aufreinigung mittels HPLC erfolgte die NMR-spektroskopische Analyse aller Glykopeptide. Nachfolgend wurden jeweils die modifizierten Peptidsequenzen des Sublancins **P47** (Tabelle 12) und des Mucins **P49** (Tabelle 13) mit den entsprechenden nativen Strukturen verglichen. Die Daten für den Vergleich wurden aus den erhaltenen NMR-Spektren entnommen und sind nachfolgend aufgelistet.

Tabelle 12. Vergleich der Verschiebungen im ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K, D_2O , bzw. Phosphatpuffer/ D_2O für den NH-Bereich) zwischen der nativen Sequenz des Sublancin 168 1-34^[298] mit der RbC²²-Mutante 14-29 **P47**.

| | NH nativ | NH RbC | H α nativ | H α RbC | H β nativ | H β RbC | H γ nativ | H γ RbC | H _{sonst.} nativ | H _{sonst.} RbC |
|--|-------------|-----------|---------------------|-------------------|--------------------|------------------|---------------------|-------------------|------------------------------|---|
| Cys ¹⁴ | 8.21 | - | 4.34 | 4.38 | 2.56 | 3.38, 3.23 | | | | |
| Ala ¹⁵ | 8.17 | 8.36 | 3.77 | 4.17 | 0.72 | 1.40 | | | | |
| Ser ¹⁶ | 7.61 | 8.42 | 4.34 | 4.48 | 3.92 | 3.93, 3.88 | | | | |
| Gly ¹⁷ | 7.84 | 8.46 | 4.00 | 4.03 | | | | | | |
| Gly ¹⁸ | 8.16 | 8.32 | 4.05, 3.94 | 4.08, 3.98 | | | | | | |
| Thr ¹⁹ | 8.06 | 8.13 | 4.36 | 4.45 | 4.26 | 4.21 | 1.22 | 1.22 | | |
| Ile ²⁰ | 8.06 | 8.27 | 4.15 | 4.21 | 1.88 | 1.90 | 1.51, 1.21 | 1.52, 1.20 | H δ 0.92 | H δ 0.93, 0.89 |
| Gly ²¹ | 8.42 | 8.50 | 4.06, 3.90 | 4.06, 4.01 | | | | | | |
| Cys ²² / RbC | 8.28 | 8.37 | 4.67 | 4.90 | 3.27, 3.04 | 3.25, 3.02 | | | | 1 _{CH} = 4.89 2 _{CH} = 3.87 3 _{CH} = 3.92 4 _{CH} = 4.09 5 _{CH2} = 3.92, 3.68 |
| Gly ²³ | 8.66 | 8.63 | 4.08, 3.96 | 4.05 | | | | | | |
| Gly ²⁴ | 8.37 | 8.31 | 3.99 | 4.01 | | | | | | |
| Gly ²⁵ | 8.40 | 8.30 | 3.91 | 3.99 | | | | | | |
| Ala ²⁶ | 8.06 | 8.15 | 4.16 | 4.42 | 1.48 | 1.42 | | | | |
| Val ²⁷ | 8.10 | 8.05 | 3.78 | 4.16 | 2.06 | 2.08 | 1.07, 0.97 | 1.10, 0.94 | | |
| Ala ²⁸ | 8.03 | 8.15 | 4.25 | 4.50 | 1.52 | 1.46 | | | | |
| Cys ²⁹ | 8.28 | 8.46 | 4.45 | 4.41 | 3.21, 3.08 | 3.32, 3.06 | | | | |

Beim Vergleich des nativen Sublancins (1-34) mit der modifizierten Sequenz (14-29) **P47** fallen einige Unterschiede in der Verschiebung der Signale auf. Besonders auffällig sind diese Unterschiede bei den ersten drei Aminosäuren (Cys¹⁴-Ser¹⁶) und im C-terminalen Bereich bei den letzten vier Aminosäuren (Ala²⁶-Cys²⁹). Dies kann einerseits daran liegen, dass die modifizierte Sequenz stark gekürzt wurde und daher in anderer Umgebung vorliegt, als in der nativen Sequenz und andererseits erfährt das gekürzte Peptid möglicherweise eine

konformationelle Änderung. Interessanterweise übt die Änderung des Zuckerbausteins in der Mitte des Peptids keinen großen Einfluss auf die umgebenden Glycine und andere Reste aus. Auch die Verschiebungen des RbC-Bausteins stimmen weitestgehend mit denen des Glucose-Analogons der nativen Sequenz überein.^[298]

Bei der Betrachtung des Mucins sind die Ähnlichkeiten zwischen nativer und modifizierter Sequenz deutlich höher (Tabelle 13). Allerdings haben beide Peptide die gleiche Länge, wurden jeweils am gleichen Peptidsynthesizer hergestellt und analog zueinander aufgereinigt. Die benachbarten Aminosäuren des RbT-Bausteins dagegen weisen leichte Verschiebungen der NH- bzw. α -Protonen gegenüber der nativen Sequenz auf, jedoch stoppt dieser Einfluss bereits bei den beidseitig anschließenden Prolin-Resten.

Tabelle 13. Vergleich der Verschiebungen im ^1H -NMR-Spektrum zwischen der nativen Sequenz^[299] des Mucin I 136-155 **P49** mit der RbT¹⁴⁴-Mutante **P48**.

| | NH nativ | NH RbT | H $_{\alpha}$ nativ | H $_{\alpha}$ RbT | H $_{\beta}$ nativ | H $_{\beta}$ RbT | H $_{\gamma}$ nativ | H $_{\gamma}$ RbT | H $_{\text{sonst.}}$ nativ | H $_{\text{sonst.}}$ RbT |
|---------------------------|-------------|-----------|------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|----------------------|--------------------------------|--|
| His ¹³⁶ | - | - | 4.13 | 4.38 | 3.14 | 3.43 | | | 7.15 8.00 | 5H = 7.45 2H = 8.68 |
| Gly ¹³⁷ | 8.55 | 8.83 | 4.03 | 4.15, 4.02 | | | | | | |
| Val ¹³⁸ | 8.31 | 8.40 | 4.25 | 4.25 | 2.12 | 2.11 | 0.96 | 0.96 | | |
| Thr ¹³⁹ | 8.34 | 8.35 | 4.43 | 4.48 | 4.28 | 4.35 | 1.21 | 1.20 | | |
| Ser ¹⁴⁰ | 8.18 | 8.16 | 4.79 | 4.52 | 3.96, 3.90 | 3.93, 3.88 | | | | |
| Ala ¹⁴¹ | 8.35 | 8.34 | 4.30 | 4.29 | 1.39 | 1.40 | | | | |
| Pro ¹⁴² | | | 4.42 | 4.41 | 2.34, 1.89 | 2.30, 1.92 | 2.06 | 2.03 | H $_{\delta}$ 3.83, 3.68 | H $_{\delta}$ 3.82, 3.65 |
| Asp ¹⁴³ | 8.45 | 8.56 | 4.64 | 4.71 | 2.75, 2.66 | 2.94, 2.83 | | | | |
| Thr ¹⁴⁴ | 8.23 | 8.22 | 4.39 | 4.36 | 4.25 | 4.23 | 1.22 | 1.20 | | 1 $_{\text{CH}}$ = 4.81 2 $_{\text{CH}}$ = 3.58 3 $_{\text{CH}}$ = 3.82 4 $_{\text{CH}}$ = 3.98 5 $_{\text{CH}_2}$ = 3.70, 3.60 |
| RbT | | | | | | | | | | |
| Arg ¹⁴⁵ | 8.28 | 8.10 | 4.61 | 4.61 | 1.85, 1.78 | 1.84, 1.74 | 1.70, 1.32 | 1.67, 1.28 | H $_{\delta}$ 3.21 | H $_{\delta}$ 3.22 |
| Pro ¹⁴⁶ | | | 4.42 | 4.41 | 2.34, 1.89 | 2.30, 1.92 | 2.06 | 2.03 | H $_{\delta}$ 3.83, 3.68 | H $_{\delta}$ 3.82, 3.65 |

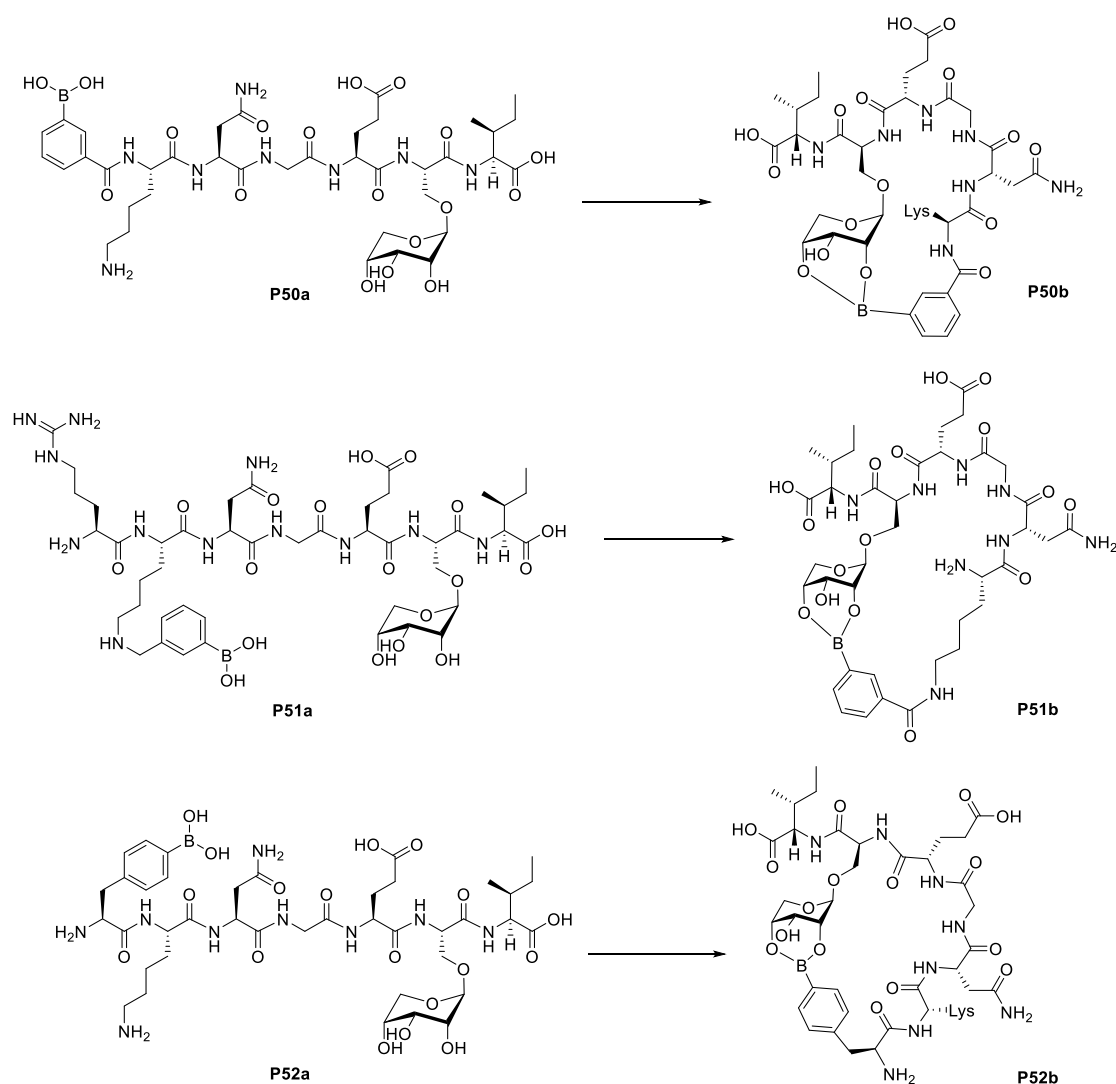
| | | | | | | | | | | |
|--------------------------|------|------|------|---------------|---------------|---------------|------|------|---------------------------------|------------------------------|
| Ala¹⁴⁷ | 8.47 | 8.46 | 4.59 | 4.59 | 1.38 | 1.37 | | | | |
| Pro¹⁴⁸ | | | 4.42 | 4.41 | 2.34, 1.89 | 2.30, 1.92 | 2.06 | 2.03 | H _δ 3.83, 3.68 | H _δ 3.82, 3.65 |
| Gly¹⁴⁹ | 8.55 | 8.53 | 4.01 | 4.00, 3.97 | | | | | | |
| Ser¹⁵⁰ | 8.32 | 8.33 | 4.55 | 4.46 | 3.95, 3.90 | 3.84, 3.79 | | | | |
| Thr¹⁵¹ | 8.07 | 8.17 | 4.39 | 4.42 | 4.26 | 4.21 | 1.20 | 1.20 | | |
| Ala¹⁵² | 8.29 | 8.28 | 4.43 | 4.58 | 1.34 | 1.35 | | | | |
| Pro¹⁵³ | | | 4.42 | 4.41 | 2.34, 1.89 | 2.30, 1.92 | 2.06 | 2.03 | H _δ 3.83, 3.68 | H _δ 3.82, 3.65 |
| Pro¹⁵⁴ | | | 4.42 | 4.41 | 2.34, 1.89 | 2.30, 1.92 | 2.06 | 2.03 | H _δ 3.83, 3.68 | H _δ 3.82, 3.65 |
| Ala¹⁵⁵ | 8.36 | 8.33 | 4.63 | 4.56 | 1.37 | 1.36 | | | | |

Ob die jeweilige Modifikation in den gezeigten Peptiden einen Einfluss auf ihre Aktivität an der entsprechenden Wirkungsstätte hervorruft, kann mit den durchgeführten Analyse-Methoden natürlich nicht überprüft werden. Daher müsste für Untersuchungen dieser Art auf biologische Tests umgestiegen werden, die jedoch in diesem Rahmen nicht durchführbar waren.

3.8 Einbindung von Boronsäuren und RAS in Peptide zur intramolekularen Zyklisierung an Testsystemen

Im Zuge der Untersuchung der Veresterungstendenz von Boronsäuren mit Diolen (bzw. Zucker) für den Einsatz als Bisubstrat-Inhibitoren oder als Fluoreszenzmarker, kam neben diesen Möglichkeiten noch eine weitere potentielle Anwendung in Frage. Bei gleichzeitigem Auftreten beider, zur Veresterung benötigter Bausteine in einem Peptid sollte es möglich sein, dieses intramolekular zu verknüpfen und somit eine Zyklisierungsmethode durch die Veresterung beider Komponenten miteinander zu schaffen. Dabei ließe sich über die Veresterung reversibel eine Zyklisierung einbringen, die einerseits dem zyklischen Produkt eine zusätzliche, strukturelle Stabilität gegenüber dem enzymatischen Abbau verschaffen würde und andererseits möglicherweise eine bereits bestehende *hairpin*-Struktur fixieren könnte. Als Modell Peptid wurde zunächst ein Ausschnitt aus dem β -*hairpin* des Foldons gewählt, um sich die bereits *turn*-induzierende Wirkung von Asn-Gly in den *turn*-Positionen $i+1$ und $i+2$ zu Nutze zu machen. Somit wäre es also sowohl interessant, nach einem stabilitäts-

steigernden Einfluss der Veresterung auf den β -hairpin zu schauen, wobei dies in Anlehnung an die Dissertation von DR. MATTHIAS KÖRLING geschehen könnte, welcher über die erhaltenen NMR-Daten seiner β -hairpin Peptide Parameter geschaffen hat, anhand derer eine Stabilitäts-einordnung möglich ist.^[309] Darüber hinaus wäre die Untersuchung der Modell-Peptide auf ihre generelle Zyklisierungstendenz durch die Veresterung zwischen Boronsäure und Zucker auch dahingehend interessant, ob auch intermolekulare Verknüpfungen beobachtet werden können oder es sogar zur Bildung von Oligomeren und Polymeren kommt. Im nachfolgenden Schema sind die synthetisierten Modell-Peptide sowohl in der linearen als auch in der zyklisierten Form gezeigt.



Schema 11. Darstellung der drei durchgeführten Zyklisierungsmethoden. Die Einführung der 3-Carboxyphenylboronsäure (3CB) erfolgte entweder *N*-terminal (**P50**, oben) oder in die Seitenkette des Lysins (**P51**, BLy - Mitte). Die Kupplung des Boronophenylalanins (Bpa) wäre an jeder Position möglich, erfolgte jedoch ebenfalls *N*-terminal (**P52**, unten).

Die Untersuchung auf die jeweilige intramolekulare Zyklisierungstendenz erfolgte sowohl mittels NMR-Spektroskopie als auch mit Massenspektrometrie. So konnte für alle drei Peptide die Masse des intramolekular zyklisierten Produkts im jeweiligen Spektrum mit der ESI⁺-Methode nachgewiesen werden. Die NMR-Analyse dagegen lieferte nur für das mit einem C-terminalen 3CB versehene Peptid **P50** ein eindeutiges Ergebnis. Der erhaltene, einfache Signalsatz im dritten Spektrum von oben (Abb. 89) zeigt das vollständig intramolekular zyklisierte Peptid **P50**. Dagegen weisen die beiden oberen Spektren mindestens zwei Produkt-Spezies oder mehr auf (**P51**, **P52**). Im obersten Spektrum (**P51**) können anhand der 2D-Spektren beide Produkte deutlich voneinander unterschieden werden (*-Markierung). In dem Spektrum (**P52**) darunter lässt sich dagegen keine klare Zuordnung mehr treffen. Was jedoch in allen Spektren deutlich zu sehen ist, ist das Erscheinen eines (oder mehrerer) neuen Signals zwischen 5.0 und 4.8 ppm, was ein Indiz für die Bildung des Boronsäureesters ist, jedoch die Unterscheidung zwischen intramolekularem oder intermolekularem Produkt nicht zulässt.

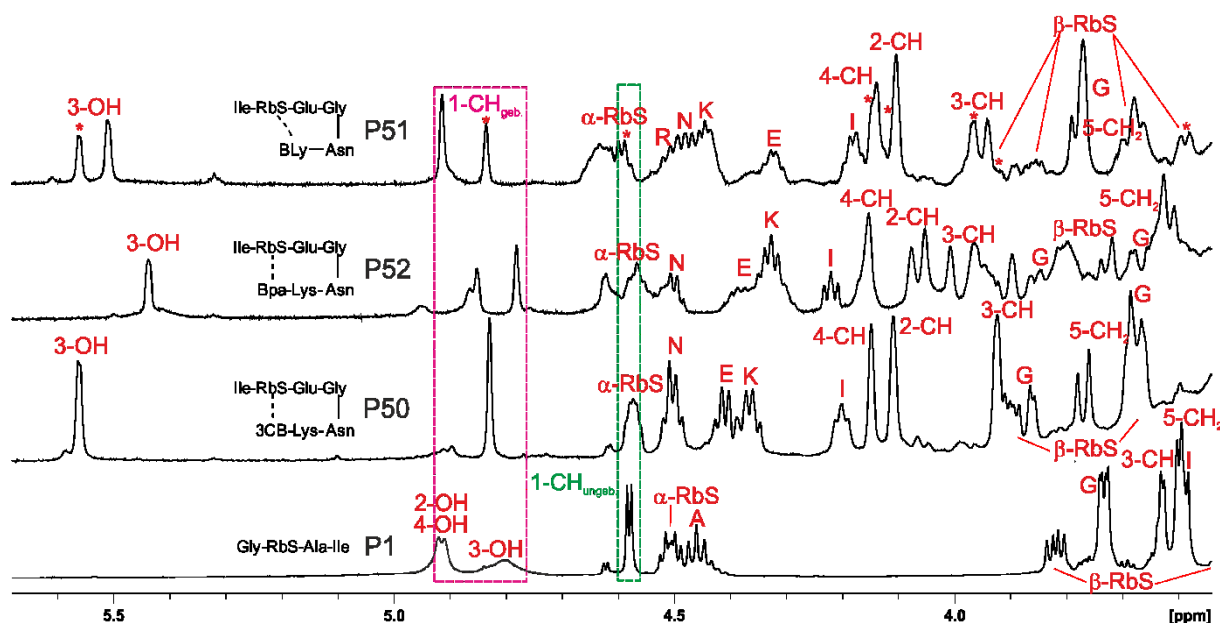


Abbildung 89. Vergleich der ¹H-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, DMSO_{d6}) der verschiedenen Zyklisierungsmethoden. Das unterste Spektrum eines Tetrapeptids **P1** dient der Darstellung des charakteristischen Peaks des anomeren Protons im ungebundenen Zustand. In den drei oberen Spektren ist dieser Peak verschwunden und ein neues Signal für das anomere Proton im Bereich von 4.95-4.75 ppm ist für die gebundene Form des RbS-Bausteins erschienen. Des Weiteren erfährt das 3-OH Signal eine Tieffeldverschiebung um ca. 0.7-0.8 ppm.

Ein anderes hilfreiches Mittel zur Bestimmung der Anzahl der verschiedenen Produkt-Spezies im Spektrum ist die CH-Korrelation im HSQC. Da die ¹³C-Verschiebung des anomeren Protons in einem charakteristischen Bereich von 110-98.0 ppm zu finden ist und dort sonst keine weiteren Signale zu erwarten sind, lässt sich darüber eine Aussage über die Anzahl der

verschiedenen Produkte im NMR-Röhrchen treffen. Der entsprechende Ausschnitt aus den HSQC-Spektren der drei verschiedenen Peptide ist in Abbildung 90 übereinandergelegt dargestellt.

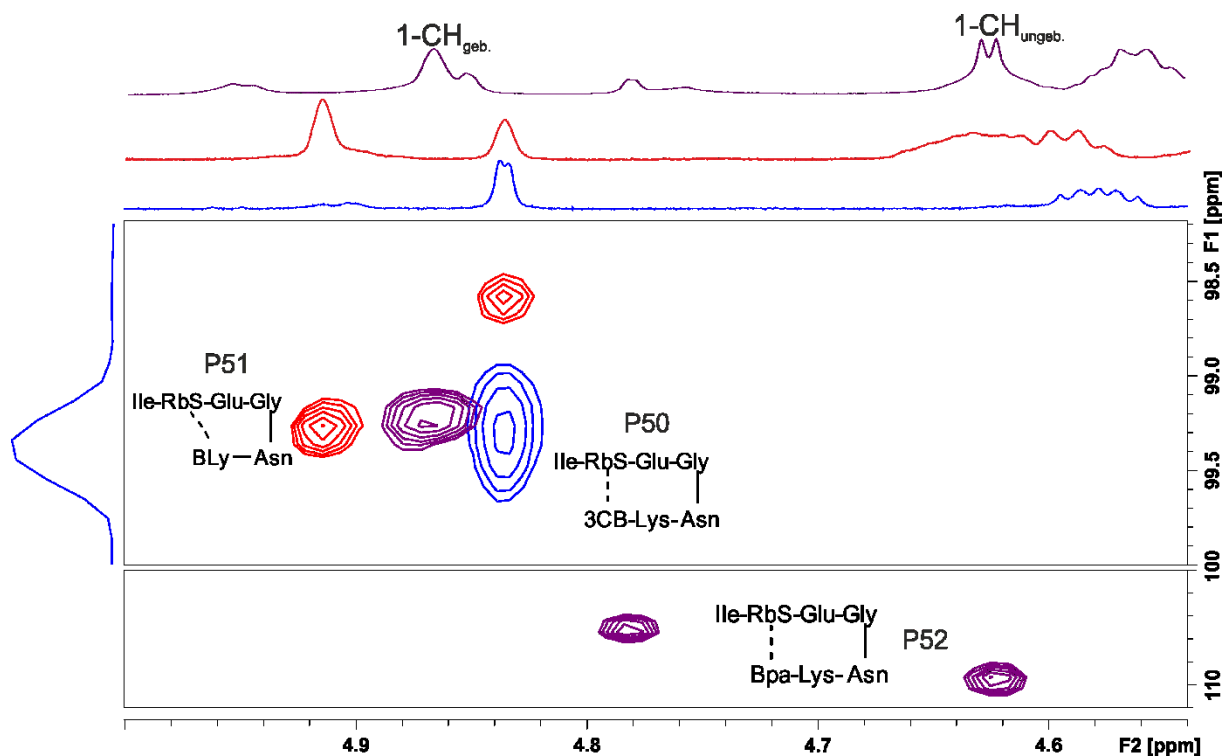


Abbildung 90. Zuordnung des anomeren Protons im jeweiligen zyklisierten Peptid anhand der charakteristischen CH-Korrelation im HSQC-Spektrum (600 MHz, 300 K, DMSO_{d6}). Die ¹³C-Verschiebung des anomeren Protons liegt stets im Bereich zwischen 98,0 und 110 ppm. Während das blaue Spektrum nur eine Hauptverbindung enthält, weist das rote Spektrum zwei Hauptverbindung in einem Verhältnis von 2:1 auf und das violette Spektrum mindestens drei Verbindungen, wobei es sich bei einer davon um das unveresterte/unzyklisierte Produkt handelt.

Wie bereits aus den ¹H-NMR-Spektren ersichtlich wurde, liegt im Spektrum des C-terminal 3CB zyklisierten Peptids **P50** nur ein Produkt vor (blaues Signal), während das über Lysin-Seitenketten-3CB (BLy) zyklisierte Peptid **P51** zwei Produkte liefert (rote Signale). Im violetten Spektrum der Bpa-Zyklisierung dagegen zeigt sich nun, dass vermutlich zwei zyklisierte Produkte **P52b/c** entstanden sind, jedoch auch noch Edukt **P52a** im NMR-Röhrchen vorhanden ist. Da mithilfe der HSQC-Spektren nun eine Aussage über die Anzahl der Produkte getroffen werden kann, sollte mittels der NOESY-Spektren nach NOE-Kontakten geschaut werden, die die intramolekulare Zyklisierung gegenüber der intermolekularen bestätigt. Die nachfolgende Abbildung zeigt Ausschnitte des NOESY-Spektrums des C-terminal 3CB zyklisierten Peptids **P50**.

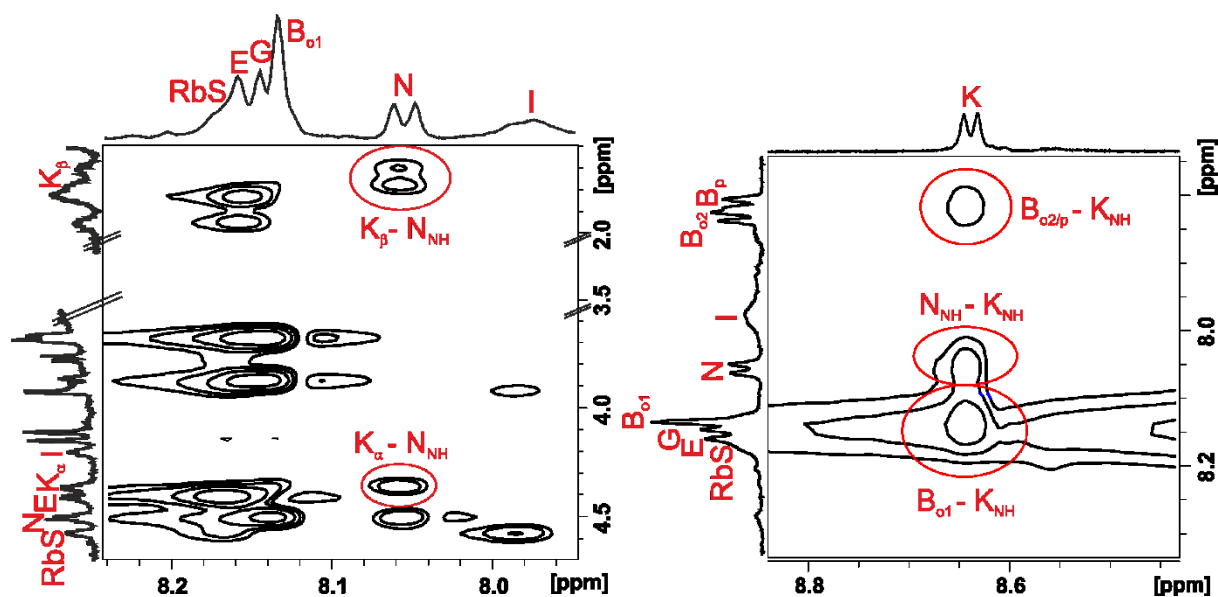


Abbildung 91. Ausschnitte des NOESY-Spektrums (600 MHz, 300 K, DMSO_{d6}) des mit 3CB zyklisierten Peptids **P50**. Gezeigt sind NOE-Signale die eine intramolekulare Zyklisierung der Verbindung stützen.

In den abgebildeten NOESY-Spektren sind einige NOE-Kontakte zwischen dem Lysin und dem Asparagin zu sehen, sowie zwischen dem Lysin und der Carboxyphenylboronsäure. Diese Signale deuten darauf hin, dass durch die Zyklisierung eine räumliche Nähe zwischen den genannten Resten entsteht. Auch die ROE-Kontakte im nachfolgenden ROESY-Spektrum dienen als Hinweis auf die räumliche Struktur.

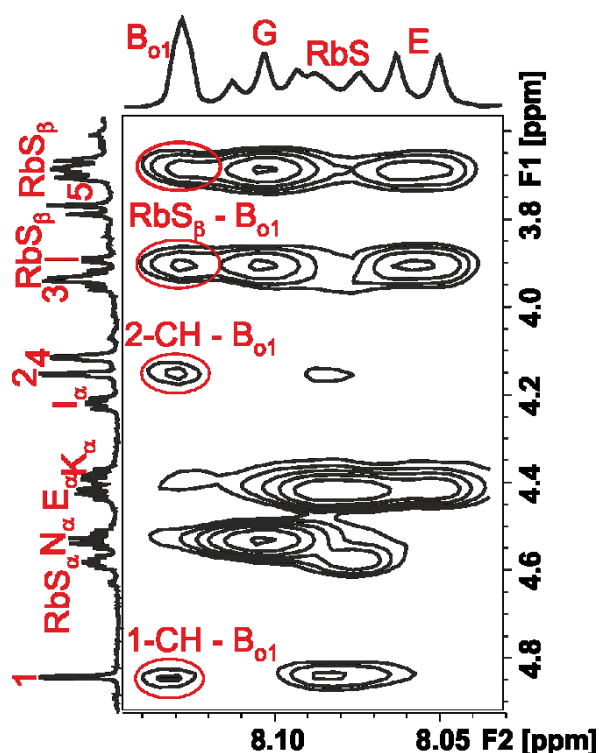


Abbildung 92. Ausschnitte des ROESY-Spektrums (600 MHz, 300 K, DMSO_{d6}) des mit 3CB zyklisierten Peptids **P50**. Das o₁-Proton der Boronsäure zeigt deutliche ROE-Kontakte zu einigen RbS-Protonen.

Darüber hinaus sind weitere Kontakte im ROESY-Spektrum zu finden, z.B. zwischen den beiden NH-Protonen des Lysins und des Asparagins, sowie zwischen dem Asn-NH und den β -Lys-Signalen. Neben den erhaltenen ESI-Spektren, in denen die Masse des intramolekularen Zyklisierungsprodukts nachgewiesen werden konnte, dienen also die ^1H -NMR- sowie die NOESY/ROESY-Spektren zur Verifizierung der intramolekularen Veresterung anhand des Nachweises der Änderung der räumlichen Struktur.

3.9 Der β -hairpin des Foldons als Leitstruktur für die intramolekulare Zyklisierung mittels Boronsäureveresterung

Wie im Kapitel zuvor bereits erwähnt wurde, beschäftigte sich DR. MATTHIAS KÖRLING in seiner Dissertation ausführlich mit der Stabilitätsbestimmung der β -hairpin Struktur des Foldons anhand verschiedener Modifikationen in der *turn*-Region.^[312] Generell wurden bisher verschiedene chemische Strategien verfolgt und entwickelt, die die β -hairpin Peptide in ihrer charakteristischen Form stabilisieren, um die Funktionalität, die mit der speziellen Struktur einhergeht, gewährleisten zu können. Zu diesem Zweck stehen drei verschiedene Verknüpfungsmethoden zur Verfügung, die eine zusätzliche Fixierung des β -hairpins ermöglichen können (Abb. 93).

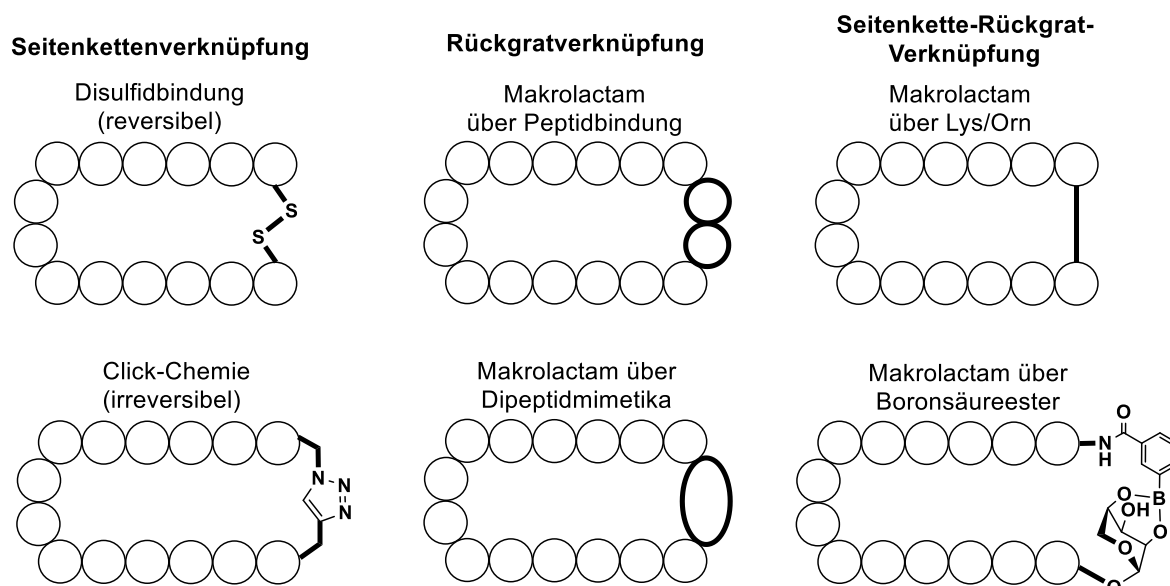


Abbildung 93. Darstellung der Zyklisierungsmethoden zur Stabilisierung von β -hairpin Peptiden.^[312] Es wird zwischen der Seitenketten-, der Rückgrat- und der Seitenketten-Rückgrat-Verknüpfung unterschieden. Unter der letztgenannten Verknüpfungsmethode wurde eine neue Variante abgebildet - die Makrolactambildung über einen Boronsäureester.

Die wohl gängigste Methode ist die Einführung von Disulfidbrücken durch Oxidation zweier Cystein-Seitenketten, welche durch Zugabe geeigneter Reduktionsmittel reversibel ist.^[267] Ebenfalls eine Form der Seitenkettenverknüpfung kann über Click-Chemie gebildet werden, welche jedoch irreversibel ist. Unter Rückgratverknüpfung fallen die beiden Makrozyklisierungstechniken der Peptidbindung zwischen dem C- und dem N-Terminus bzw. die Einführung von Dipeptidmimetika wie das im Arbeitskreis von A. GEYER entwickelten Hot=Tap-Bausteins.^[315] Eine weitere Alternative bietet die Seitenketten-Rückgrat-Verknüpfung zwischen einer Lysin/Ornithin/Aminohexansäure u. ä. Seitenkette mit dem eigenen C-Terminus zum Makrolactam, oder die Verknüpfung über eine Veresterung zwischen der N-terminal integrierten Boronsäure und dem RbS-Baustein als neue Methode. Die letztgenannte Methode wurde im Laufe dieser Arbeit ausführlicher betrachtet und die Ergebnisse sind nachfolgend, in Anlehnung an die Testsysteme aus dem Kapitel zuvor, aufgeführt. Zunächst werden dafür in Abbildung 98 die synthetisierten β -*hairpin* Peptide (**P53-P56**) mit den jeweiligen Modifikationen zur intramolekularen Zyklisierung modellhaft aufgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

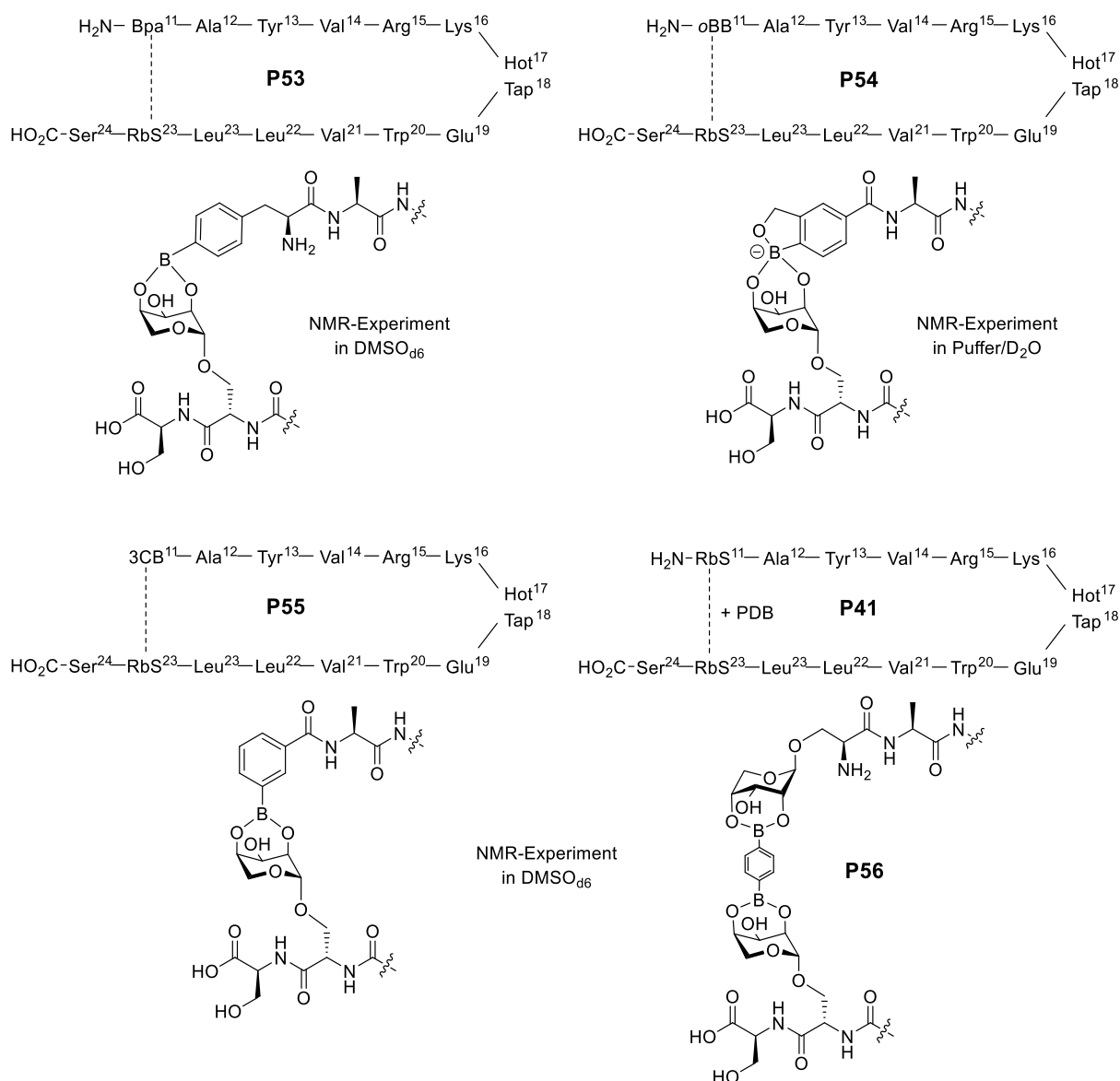


Abbildung 94. Übersicht der verschiedenen Modifikation im β -hairpin des Foldons zur intramolekularen Zyklisierung. Es wurde jeweils an Position 11 eine Boronsäure eingeführt und an Position 23 der RbS-Baustein. Die Peptide mit den *N*-terminalen Modifikationen Boronophenylalanin (**P53**, Bpa), 3-Carboxyphenylalanin (**P55**, 3CB) sowie das Peptid mit zwei RbS-Bausteinen **P41** und anschließender Zugabe von Phenyldiborsäure (PDB) zum Peptid **P56** wurden jeweils in DMSO_{d_6} vermessen. Das NMR-Experiment der *ortho*-Benzoboroxol-Mutante **P54** wurde aufgrund der Bindungseigenschaften der Boronsäure in einem wässrigen Puffer/ D_2O Gemisch durchgeführt.

Nachfolgend sind die erhaltenen ^1H -NMR-Spektren der verschiedenen β -hairpin Peptide abgebildet und die entscheidenden Merkmale für den Nachweis der Veresterung farblich hervorgehoben.

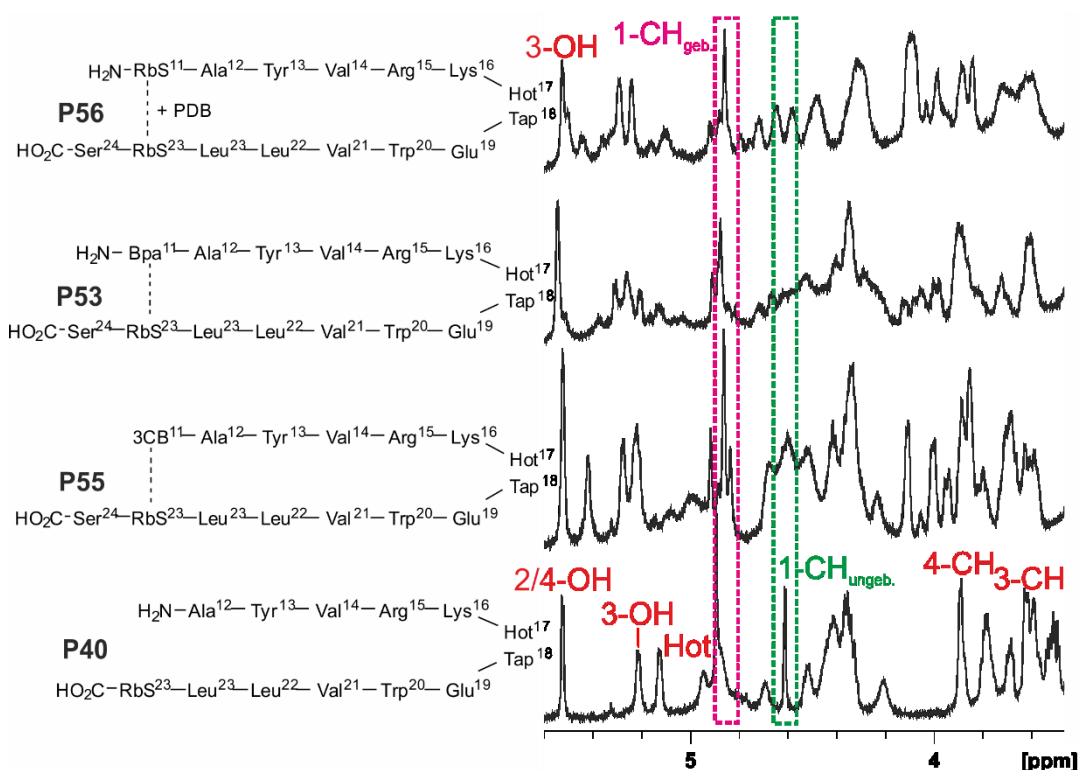


Abbildung 95. Übersicht über die verschiedenen, mutierten β -hairpin Peptide und die Ausschnitte aus den entsprechenden ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, DMSO-d_6) für den Nachweis einer erfolgten Veresterung. Grün markiert ist der Bereich, indem der Peak des ungebundenen anomeren Protons des Zuckers liegt (siehe unterstes Spektrum). Der rot markierte Bereich zeigt den neu entstandenen Peak des anomeren Protons nach der Veresterung mit einer Boronsäure.

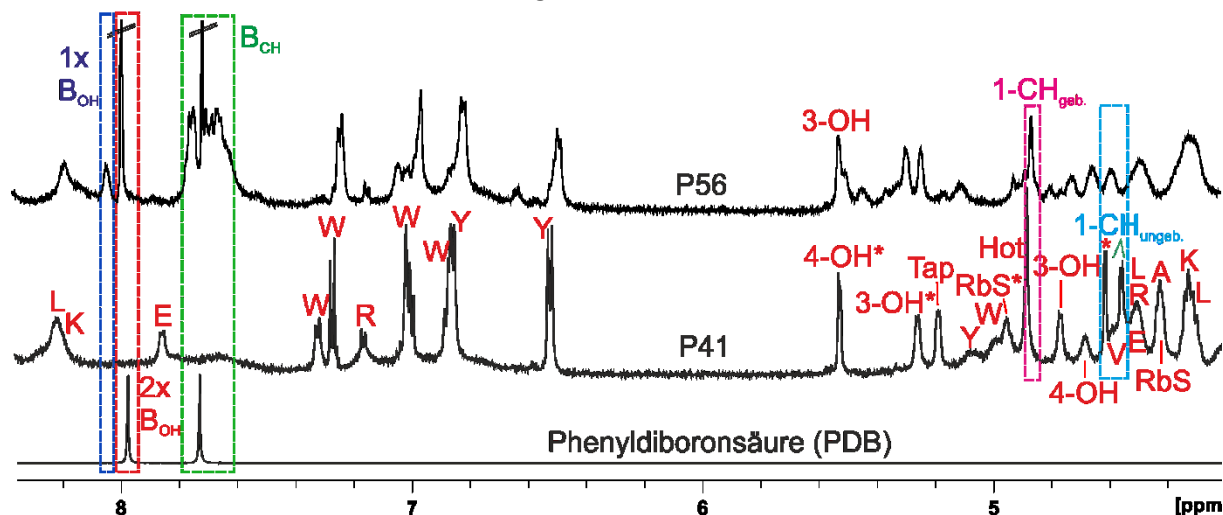
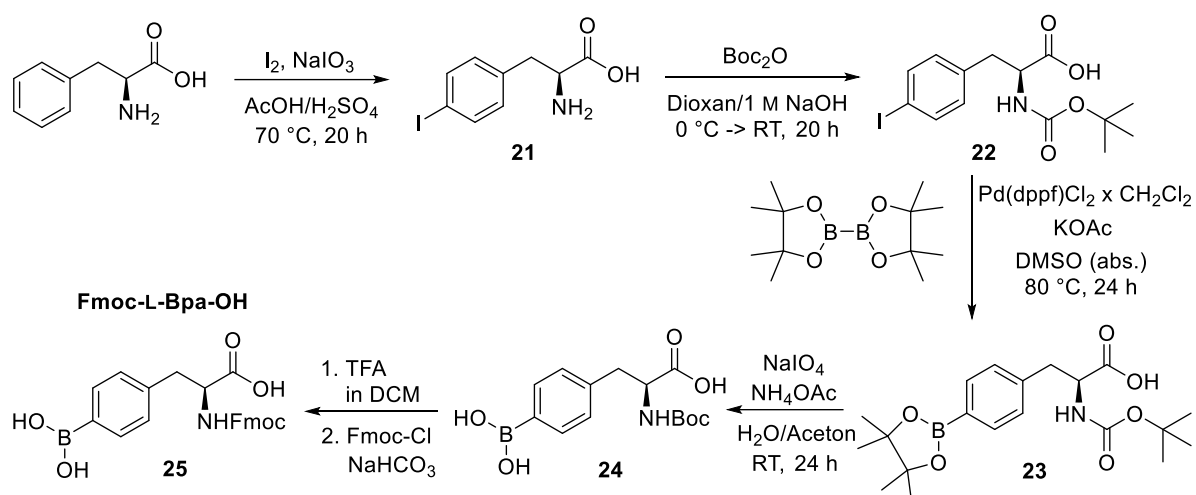


Abbildung 96. Untersuchung der intramolekularen Zyklisierung mittels ^1H -NMR Spektroskopie (600 MHz, 300 K, DMSO-d_6). Vergleich der Spektren vor und nach Zugabe der Phenylidiboronsäure zum, mit zwei RbS-Bausteinen modifizierten, β -hairpin Peptid **P41**. Die Modifikationen befinden sich jeweils an Position 11 und 23. Erneut sind die Peaks für das anomere Proton in gebundener (rot) und ungebundener (hellblau) Form markiert. Weiterhin kann eine Änderung im aromatischen Bereich beobachtet werden. Das breiter werdende Signal für die aromatischen Signale der Boronsäure im oberen Spektrum (grün) weist ebenfalls auf die Veresterung durch Aufhebung der Symmetrie der freien PDB hin. Auch liegt eine kleine Menge der einfach veresterten PDB vor, welches blau markiert ist.

Die gezeigten Spektren weisen alle die zu erwartenden, charakteristischen Signale für eine erfolgte Veresterung auf. Auch wenn aufgrund der Komplexität der erhaltenen Produkte nicht bei allen Verbindungen die Kopplungskonstante des anomeren Protons abgelesen werden konnte, so konnte doch stets die typische Tieffeldverschiebung des entsprechenden Signals beobachtet werden. Wie bereits bei den Testpeptiden aus dem vorherigen Kapitel entsteht auch hier vermutlich nicht nur das intramolekulare Zyklisierungsprodukt, sondern möglicherweise auch intermolekular verknüpfte β -*hairpin* Peptide. Eine Bestätigung für diese Vermutung ergibt sich aus den gemessenen HSQC-Spektren, welche mehrere, nebeneinanderliegende Peaks für die entsprechende CH-Korrelation des anomeren Protons zeigen. Im Fall des β -*hairpin* Peptids mit zwei RbS-Bausteinen in der Sequenz und der extern zugefügten Boronsäure konnten, zusätzlich zu den genannten Merkmalen, die Signale der Boronsäure Aufschluss über die erhaltenen Produkt-Spezies im Spektrum geben. So werden für die Phenyldiboronsäure drei verschiedene Signale erhalten, die anhand der farbigen Markierung in Abbildung 96 zugeordnet wurden. Das tieffeldigste Signal (blau) ist der einfach veresterten Boronsäure zuzuordnen und weist die geringste Intensität auf. Das rot markierte Signal gehört zur beidseitig freien Boronsäure und deutet auf einen Überschuss an Boronsäure im NMR-Röhrchen hin, da die RbS-Bausteine vollständig umgesetzt wurden (hellblau markierter Bereich). Die grüne Markierung umfasst die aromatischen Signale der Boronsäure und weist im oberen Spektrum eine Multipllett-Aufspaltung auf, da die Symmetrie des Moleküls im Zuge der Veresterung aufgehoben wird, was ein weiteres Indiz für die stattfindende Veresterung der Boronsäure mit den RbS-Bausteinen ist. Somit kann die Methode der Boronsäureveresterung zwar durchaus als Zyklisierungsvariante dienen, jedoch birgt dies einige Schwierigkeiten aufgrund der Möglichkeit der intermolekularen Zyklisierung als Nebenreaktion. Durch eine Anpassung der Reaktionsbedingungen könnte jedoch das Gleichgewicht möglicherweise zu Gunsten der intramolekularen Zyklisierung verschoben werden, sodass die Methode eine nennenswerte Alternative zu den gängigen Zyklisierungsmethoden zur Stabilisierung von β -*hairpin* Peptiden werden könnte. Darüber hinaus wäre die Veresterung zwischen Boronsäuren und RAS-Bausteinen sicherlich auch zur Zyklisierung anderer Peptide von Nutzen, sofern die benötigten Bausteine von der jeweiligen Peptidstruktur toleriert werden.

3.10 Synthese von 4-Iod- bzw. 4-Borono-Phenylalanin und 4,4'-Biphenylalanin

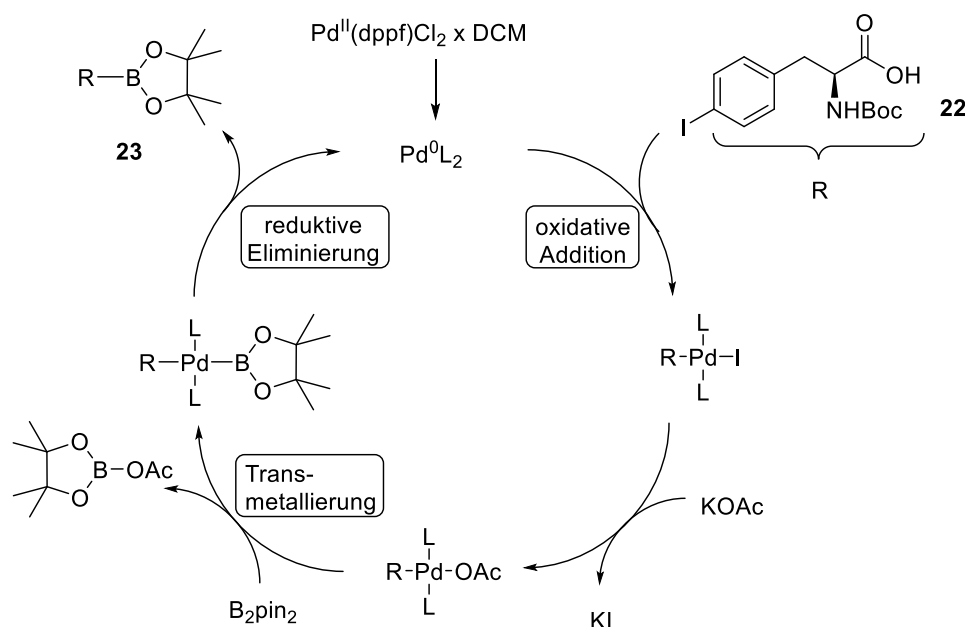
Das Einbringen von Boronsäuren in peptidische Systeme unter dem Gesichtspunkt der Zucker-Veresterung wurde im Zuge dieser Arbeit noch auf eine weitere Art bewerkstelligt. Nicht nur die Zugabe von niedermolekularen Boronsäure-Derivaten zu RAS-enhaltenden Peptiden ermöglicht die Integration solcher Verbindungen in peptidische Umgebung, sondern auch eine Aminosäure Modifikation kann dahingehend erfolgen. Als Startmaterial für die Synthese einer Aminosäure, die mit einer aromatischen Boronsäure versehen werden sollte, diente Phenylalanin, welches bereits literaturbekannte Syntheserouten für den Aufbau einer solchen Aminosäure bot (Schema 12).^[303,304] Begonnen wurde mit der elektrophilen aromatischen Substitution des ungeschützten L-Phenylalanins mit elementarem Iod und Natriumiodat ($I_2 + 3I(V) \rightarrow 5I^{3+}$) in Essigsäure/Schwefelsäure unter reflux. Anschließend erfolgte die Boc-Schützung des Amins zum Carbamat nach einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus. Im nächsten Schritt folgte die Einführung der Boronsäure.



Schema 12. Syntheseroute des Fmoc-4-Borono-L-Phenylalanins **25** (Fmoc-L-Bpa). Das Zwischenprodukt Iod-Phenylalanin **21** wurde ebenfalls Fmoc-geschützt und für die Festphasenpeptidsynthese eingesetzt.

Die hier verwendete Methode führte über eine MIYaura-Borylierung der Boronsäure an ein Arylhalogenid unter Verwendung des Bis(Pinakolato)diborons (B_2pin_2), wobei die Reaktion ähnlich der SUZUKI-Reaktion verläuft, jedoch nach Bildung des Pinakolesters im Zuge der reduktiven Eliminierung beendet wird (Schema 13). Damit die Reaktion an dieser Stelle endet und es nicht zur anschließenden SUZUKI-Reaktion kommt, muss die Aktivierung des Pinakolesters zum Lewis-Säure-Base-Addukt unterbunden werden. Dies geschieht durch die Verwendung einer schwachen Base wie KOAc, da die Bildung des Acetato-Palladium-

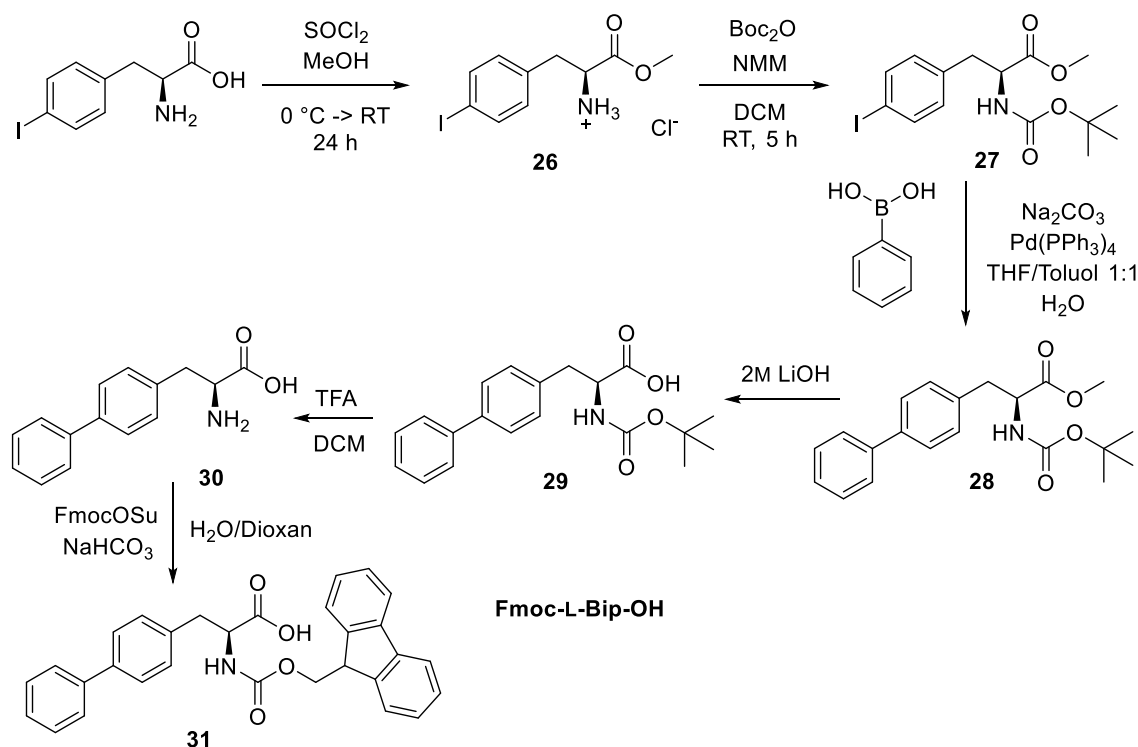
Komplexes einen Einfluss auf die Reaktionskinetik der Transmetallierung hat, resultierend aus der höheren Reaktivität der Pd-O- gegenüber der Pd-X-Bindung nach dem HSAB-Prinzip. Der Einsatz von stärkeren Basen wie K_3PO_4 oder K_2CO_3 würde zur Reaktion mit einem weiteren Aryliodid führen und somit das entsprechende Biphenyl als Produkt liefern.^[303,304]



Schema 13. Katalysezyklus der Miyaura-Borylierung. Durch die Verwendung einer schwachen Base kann eine Aktivierung des Pinakolesters unterbunden werden, sodass es nicht zu einer anschließenden SUZUKI-Kupplung kommt.^[303]

Im Anschluss an die Kupplung musste die, als Pinakolester geschützte Boronsäure **23**, verseift werden, indem der Ester mit einer Lösung aus Natriumperiodat und Ammoniumacetat in Wasser/Aceton behandelt wurde. Zuletzt wurde eine Decarboxylierung zur Entfernung der Boc-Schutzgruppe durch TFA-Zugabe eingeleitet und anschließend eine Fmoc-Schätzung, für den Einsatz des 4-Borono-L-Phenylalanins (L-Bpa) in der Festphasenpeptidsynthese, durchgeführt. Die Ausbeute für die sechsstufige Synthese des Fmoc-L-Bpa-OH **25** betrug 21 %. Im Zuge der Synthese des L-Bpa wurden noch zwei weitere unnatürliche Aminosäuren hergestellt, welche zu Vergleichsstudien anstelle von Tyrosin in Peptiden eingesetzt werden sollten. Zum einen wurde Iod-Phenylalanin **21** (4IF) zu diesem Zweck Fmoc-geschützt (**32**), um es für die Peptidsynthese verwenden zu können und zum anderen wurde die SUZUKI-Kupplung mit 4-Iod-L-Phenylalanin und Phenylboronsäure durchgeführt, um 4,4'-L-Biphenylalanin (Bip) zu erhalten. Dafür wurde *N*-Boc-4-Iod-L-phenylalanin Methylester **27** hergestellt und in der Palladium(0)-katalysierten Kreuzkupplung zum entsprechenden Biphenylalanin umgesetzt.^[305] Die anschließende Schutzgruppen-Chemie beinhaltete die

Verseifung des Methylesters mit Lithiumhydroxid, die Boc-Entschützung mit TFA und die finale Fmoc-Schützung zu Fmoc-L-Bip-OH **31** (Schema 14).



Schema 14. Syntheseroute des Fmoc-L-Biphenylalanins **31** über eine SUZUKI -Reaktion ausgehend von 4-Iod-L-Phenylalanin.^[306]

Die Synthese des Fmoc-L-Bip-OH **31** lieferte 33 % Ausbeute über sechs Stufen. Während die beiden letztgenannten Aminosäuren (4IF und Bip) im Anschluss sowohl in die Sequenz des Leu-Enkephalins als auch des β -hairpins des Foldons an der Position des Tyrosins eingebaut wurden, diente das Bpa überwiegend zu Zyklisierungsversuchen in RAS-enthaltenden Peptiden.

3.10.1 Einbau der Phenylalanin-Derivate in Leu-Enkephalin

Um die beiden synthetisierten Phenylalanin-Derivate (**31**, **32**) auf ihr Verhalten in der Festphasenpeptidsynthese und letztlich in peptidischen Systemen zu testen, wurden einfache Sequenzen gewählt, die schnell zu synthetisieren sind und bereits gut untersucht wurden. Unter dieser Prämisse wurde Leu-Enkephalin (**P57**) als Modellstruktur gewählt, da dies in der Literatur häufig für den Einbau von Modifikationen genutzt wird und bereits Versuche unternommen wurden, den Tyrosin-Rest am Harz mittels SUZUKI-Reaktion einer C-C-Bindungsknüpfung zu unterziehen.^[307-309] Darüber hinaus ist in der Literatur die Rede von einer

β _I-turn Struktur, dessen Stabilität daher in Bezug auf eine Tyrosin-Mutation untersucht werden sollte.^[310] Die Synthese der Peptide wurde mittels SPPS unter Einsatz der entsprechenden Fmoc-Bausteine durchgeführt. Zwar wurden entsprechende Versuche getätigt, um das eingebaute Iod-Phenylalanin am Harz mittels SUZUKI-Reaktion in das Biaryl zu überführen, jedoch schlugen diese Experimente trotz Variation der Reaktionsbedingungen und des Harzes fehl, sodass der Fmoc-Biaryl-Baustein **31** in Lösung hergestellt und anschließend via SPPS eingebaut wurde. Nach erfolgreicher Synthese der Leu-Enkephalin-Peptide (**P58**, **P59**) konnten diese direkt (zumeist ohne weitere Aufreinigung mittels HPLC) NMR-spektroskopisch untersucht werden. Die Zuordnung der Signale erfolgte unter Zuhilfenahme der entsprechenden 2D-Spektren. Eine Übersicht über die erhaltenen ¹H-NMR-Spektren ist in Abbildung 97 dargestellt.

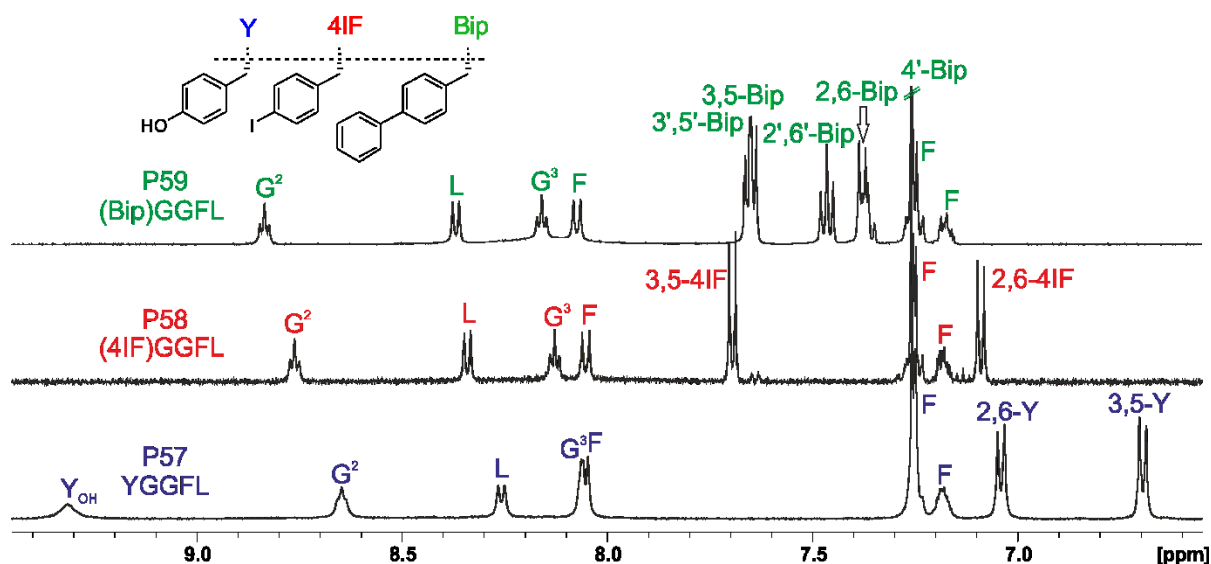


Abbildung 97. Vergleich der ¹H-NMR-Spektren (500 MHz, 300 K, DMSO_{d6}) der verschiedenen Leu-Enkephalin Peptide. Das N-terminale Tyrosin wurde jeweils gegen 4-Iod-Phenylalanin **P58** (4IF, rot) bzw. 4,4'-Biphenylalanin **P59** (Bip, grün) ausgetauscht. Die Signalzuordnung erfolgte anhand der 2D-Spektren.

Aus den erhaltenen ¹H-NMR-Spektren geht hervor, dass sich sowohl Änderungen der chemischen Verschiebung als auch der Kopplungskonstanten durch Mutation des Tyrosins ergeben. Am stärksten betroffen sind dabei die unmittelbar in Nachbarschaft befindlichen Aminosäuren - Glycin 2 und 3. Die Tieffeldverschiebung des direkt benachbarten Glycins (Position 2) ist für die Bip-Mutation **P59** am größten (0.19 ppm gegenüber 0.11 ppm), wobei die Kopplungskonstante der 4IF-Mutation **P58** den größten Wert aufweist (5.7 Hz gegenüber 5.5 Hz und 5.0 Hz in der nativen Sequenz). Die übrigen Verschiebungen der NH-Protonen der mutierten Sequenzen sind denen der nativen Sequenz sehr ähnlich, lediglich die aromatischen Signale der Phenylalanin-Derivate unterscheiden sich sowohl untereinander als auch gegenüber

dem Tyrosin. So sind die Signale der Protonen an Position 3 und 5 im Aromaten sehr deutlich, um etwa 1.00 ppm, tieffeldverschoben im Vergleich zum Tyrosin (4IF = 7.69 ppm, Bip = 7.66, 7.64 ppm, Tyr = 6.69 ppm). Um den potentiellen Einfluss der Mutationen auf eine konformationelle Änderung der Struktur bestimmen zu können und um zu sehen, ob generell eine β -turn Struktur vorliegt, wurde zusätzlich eine Temperaturreihe der entsprechenden Peptide von 300 - 320 K in 5 K Schritten aufgenommen (Abb. 98).

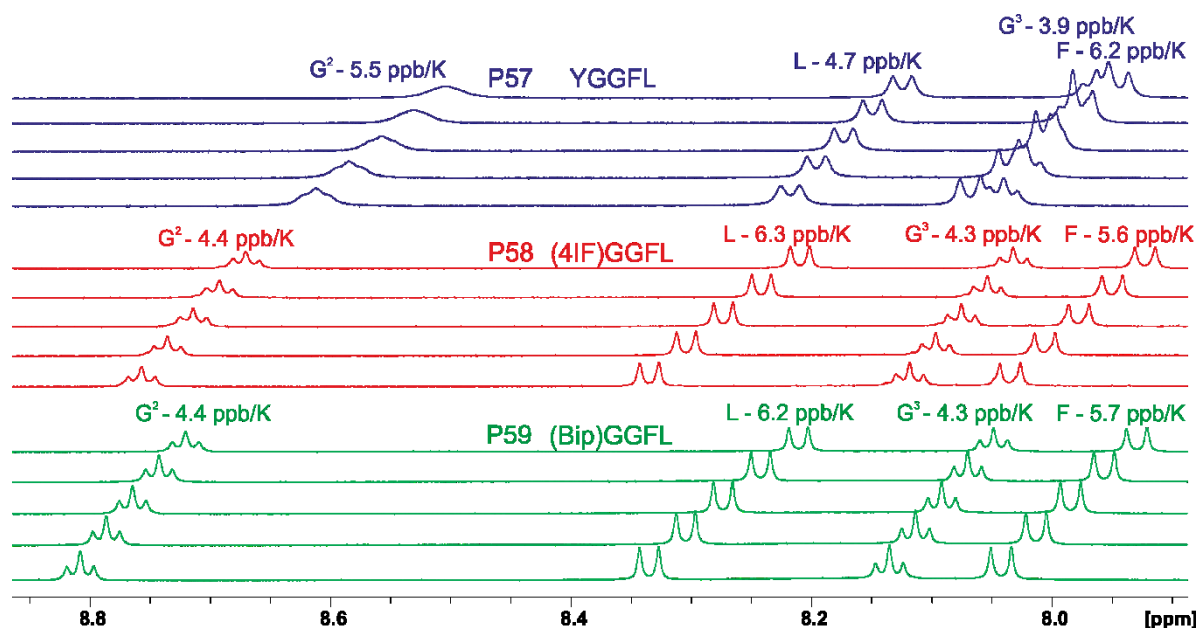


Abbildung 98. ^1H -NMR Messung (500 MHz, 300 K, DMSO-d_6) bei unterschiedlichen Temperaturen (300-320 K in 5 K Schritten). Die berechneten Temperaturgradienten über den genannten Temperaturbereich sind oberhalb eines jeden Signals in ppb/K zu finden.

In den ^1H -NMR-Spektren unterschiedlicher Temperaturen zeigt sich, dass offenbar keine β -turn Struktur im Peptid vorherrscht, da dann kleinere Werte für die Temperaturgradienten erhalten worden wären. Auch sind die Änderungen in den beiden mutierten Strukturen gegenüber der nativen Sequenz nicht linear, da die Werte für das Phenylalanin und das Glycin an Position 2 bei den Mutanten kleiner, die Werte für das Leucin und das Glycin an Position 3 jedoch größer sind. Somit ist es schwierig anhand dieser Daten eine Aussage über eine potentielle konformationelle Änderung der mutierten Sequenzen gegenüber der nativen Sequenz zu treffen. Aus diesem Grund wurden die gleichen Mutationen in ein größeres peptidisches System übertragen und dort auf ihre Einflussnahme untersucht.

3.10.2 Einbau der Phenylalanin-Derivate in den β -hairpin des Foldons

Neben der Leu-Enkephalin-Sequenz wurden die Phenylalanin-Derivate auch in ein größeres peptidisches System eingebaut - den β -hairpin des Foldons, welcher im Gegensatz zu Leu-Enkephalin bereits eine Vorzugskonformation besitzt. Dafür wurde sowohl die native Sequenz des β -hairpins mit Asn-Gly turn, als auch die von DR. MATTHIAS KÖRLING in seiner Dissertation etablierte Sequenz mit dem Dipeptidmimetikum Hot=Tap im turn, verwendet.^[312]

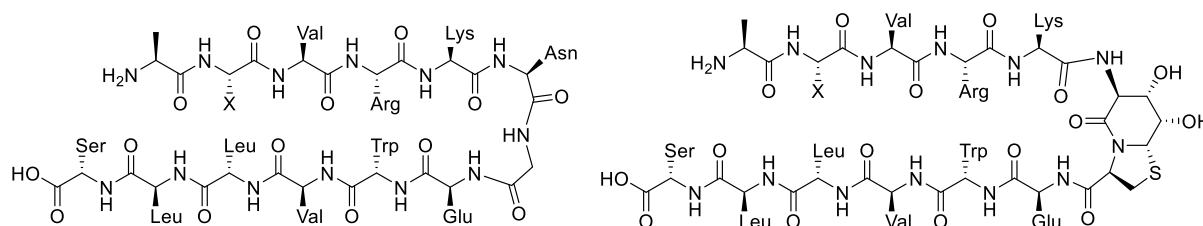


Abbildung 99. Darstellung der beiden β -hairpin Peptide mit unterschiedlichen turn-Strukturen. An die Position X (eigentlich Tyr) wurden jeweils die Phenylalanin-Derivate eingebracht.

Die Synthese der Sequenzen erfolgte am Peptidsynthesizer unter Einsatz der entsprechenden Fmoc-Phenylalanin-Derivate - 4-Iod-Phenylalanin und 4,4'-Biphenylalanin. Anschließend erfolgte die Aufreinigung mittels HPLC und die NMR-spektroskopische Vermessung in Phosphatpuffer/D₂O bei pH = 3. Nachfolgend sind die erhaltenen ¹H-NMR-Spektren dargestellt.

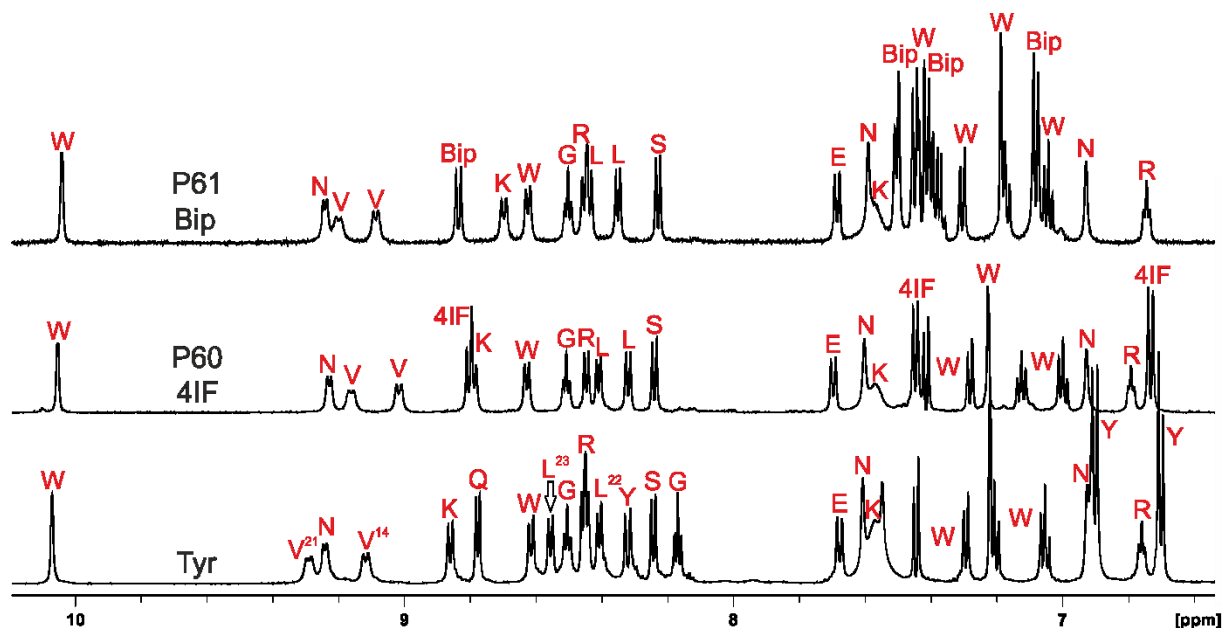


Abbildung 100. Vergleich der ¹H-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/D₂O 9:1, pH = 3) der verschiedenen β -hairpin Peptide mit Asn-Gly-turn. Das N-terminale Tyrosin wurde jeweils gegen 4-Iod-Phenylalanin **P60** (4IF) bzw. 4,4'-Biphenylalanin **P61** (Bip) ausgetauscht. Die Signalzuordnung erfolgte anhand der 2D-Spektren. Die native Sequenz (unten) enthält N-terminal zusätzliche ein Glutamin.

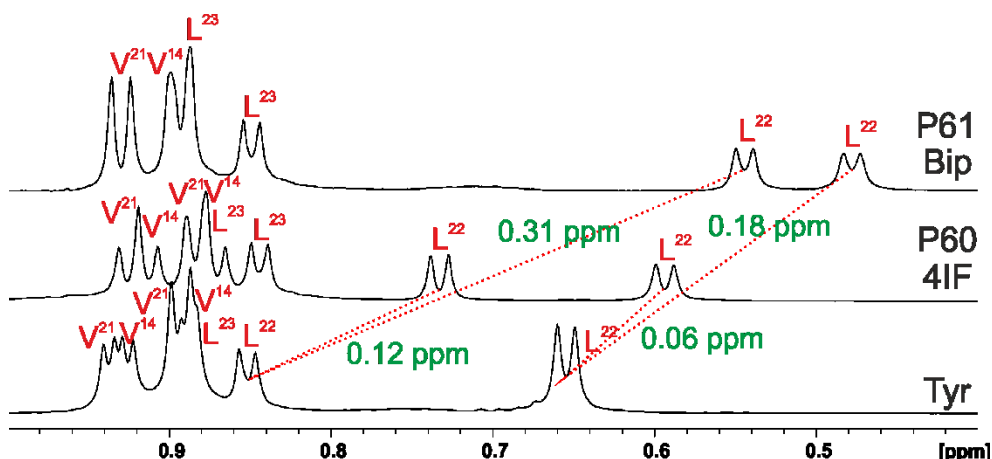


Abbildung 101. Vergleich der chemischen Verschiebung der δ -Leucin-Signale in den ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/ D_2O 9:1, pH = 3) der verschiedenen β -hairpin Peptide mit Asn-Gly-turn.

Während im NH-Bereich der ^1H -NMR-Spektren außer den Tieffeld-Verschiebungen des NH-Signals der mutierten Aminosäuren (4IF - 0.55 ppm bzw. Bip - 0.60 ppm) und der aromatischen Signale keine allzu deutlichen Veränderungen auftreten (Abb. 100), kann im aliphatischen Bereich bei den δ -Leucin Signalen eine starke Hochfeld-Verschiebung verzeichnet werden (Abb. 101). Im Vergleich zur nativen Sequenz kommt es hier zu Verschiebungen von bis zu -0.31 ppm im Falle der Bip-Mutation **P61**. Diese Werte üben letztlich einen Einfluss auf die Berechnung der Stabilität des β -hairpins aus. Bei der Hot=Tap-Variante können ähnliche Beobachtungen gemacht werden (Abb. 102, 103).

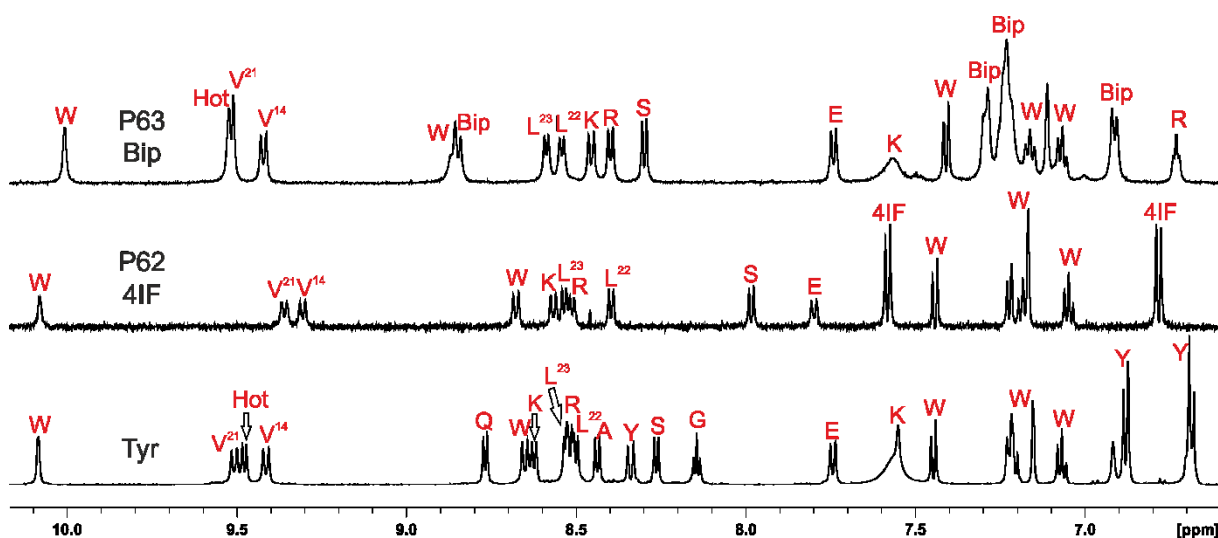


Abbildung 102. Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/ D_2O 9:1, pH = 3) der verschiedenen β -hairpin Peptide mit Hot=Tap-turn. Das N-terminale Tyrosin wurde jeweils gegen 4-Iod-Phenylalanin **P62** (4IF) bzw. 4,4'-Biphenylalanin **P63** (Bip) ausgetauscht. Die Signalzuordnung erfolgte anhand der 2D-Spektren. Die native Sequenz (unten) enthält N-terminal zusätzlich ein Glutamin.

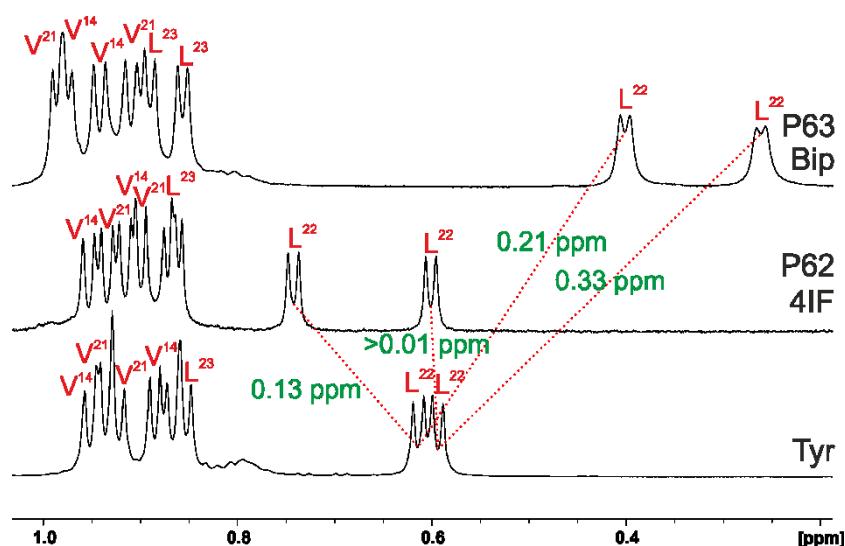


Abbildung 103. Vergleich der chemischen Verschiebung der δ -Leucin-Signale in den ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, Phosphatpuffer/ D_2O 9:1, pH = 3) der verschiedenen β -hairpin Peptide mit Hot=Tap-turn.

Im Falle der Bip-Mutation **P63** im β -hairpin mit Hot=Tap-turn treten ähnliche Veränderungen im NH- bzw. aromatischen Bereich auf (Abb. 102). Jedoch zeigt sich hier ein stärkerer Einfluss der 4IF-Mutation **P62** auf die Struktur, da die NH-Signale generell eine Hochfeld-Verschiebung erfahren. Im aliphatischen Bereich (Abb. 103) zeigt sich der gleiche Trend - die Bip-Mutation liefert sehr ähnliche Ergebnisse wie im β -hairpin mit Asn-Gly-turn (Verschiebung von 0.21 bzw. 0.33 ppm der δ -Leucin Signale), während die 4IF-Mutation sogar zu einer Tieffeld-Verschiebung führt (0.01 bzw. 0.13 ppm). Anhand der erhaltenen 2D-Spektren der Verbindung **P63** konnte ein Strukturvorschlag basierend auf den ROE-Signalen mittels HyperChem® erstellt werden (Abbildung 104).

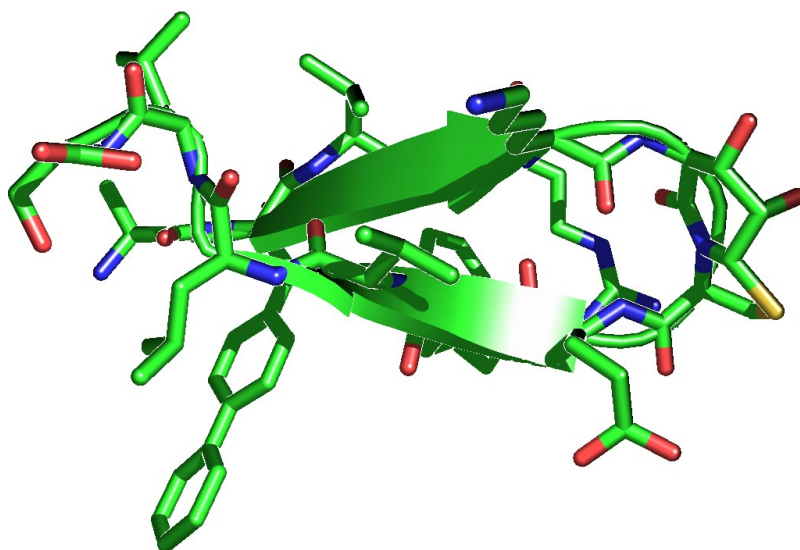


Abbildung 104. Mit HyperChem® berechnete, energieminierte Durchschnittskonformation basierend auf ROE-Kontakten. An Position 13 befindet sich die Bip-Mutation (Biaryl-Rest unten links).

Mithilfe der Ergebnisse aus den ^1H -NMR-Spektren wurden weiterhin zunächst die *CSD*-Werte (*chemical shift deviations*) und später die relativen Faltungspopulationen der verschiedenen β -*hairpin* Peptide anhand der aufgeführten Formeln aus den Dissertationen von DR. MATTHIAS KÖRLING und STEFAN LENZ (noch unveröffentlicht) berechnet.^[312]

$$CSD = \Delta\delta C_{\alpha}H = \delta C_{\alpha}H_{gefaltet} - \delta C_{\alpha}H_{ungefaltet} \quad (\text{III})$$

Für die Werte der ungefalteten Referenz dienen die $C_{\alpha}H$ -Verschiebungen (*CSD*-Werte) der völlig unstrukturierten *random-coil*-Form, welche sich entweder aus den Literaturwerten von WISHART entnehmen lassen,^[311] oder aber aus der Dissertation von DR. MATTHIAS KÖRLING.^[312] Die Verwendung dieser Formel zur Bestimmung der Population des gefalteten Zustands kann über den Vergleich der $C_{\alpha}H$ -Werte vollzogen werden, da speziell die α -Protonen sehr empfindlich auf konformationelle Änderungen ansprechen aufgrund ihrer direkten Einbindung in das Peptidrückgrat.^[313] Für die gefaltete Spezies wird ein zwei-Zustands-System angenommen, in welchem von der, über die NMR-Zeitskala im schnellen Austausch zueinander stehenden, gefalteten und ungefalteten Spezies ausgegangen wird. Beide Zustände werden über die gemessenen NMR-Daten als populationsgewichtete Mittelwerte dargestellt.^[312,314]

Zur Berechnung der relativen Faltungspopulation, als Vergleich zwischen β -*hairpin* Peptiden mit Einzelmutationen, werden die ACS-Werte (*average chemical shift*) der αH -Protonen benötigt. Dafür werden alle $\delta C_{\alpha}H$ -Werte des jeweiligen β -*hairpin* Peptids, bis auf die *turn*-Region (i bis einschließlich $i+3$) summiert und entsprechend der Formel IV durch die Anzahl der enthaltenden Aminosäuren geteilt.^[311,312]

$$ACS = \frac{\sum \delta \text{ aller AS} - \sum \delta \text{ turn AS}}{\text{Anzahl aller AS im Peptid} - 4} \quad (\text{IV})$$

Weiterhin werden für die Berechnung der relativen Faltungspopulation eine 0% Referenz (*random coil*) benötigt, die ebenfalls aus der Literatur von WISHART entnommen werden kann und eine 100% Referenz, anhand derer alle anderen Faltungspopulationen relativ dazu bestimmt werden.^[311] Mithilfe dieser Werte kann nun die Faltungspopulation mit nachfolgender Formel (bei einer Streuung von 15%) bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind für alle synthetisierten β -*hairpin* Peptide in Tabelle 14 zusammengefasst.

$$FP = \frac{100}{ACS_{100\%ref.} - ACS_{0\%ref.}} \cdot (ACS - ACS_{0\%ref.}) \quad (\text{V})$$

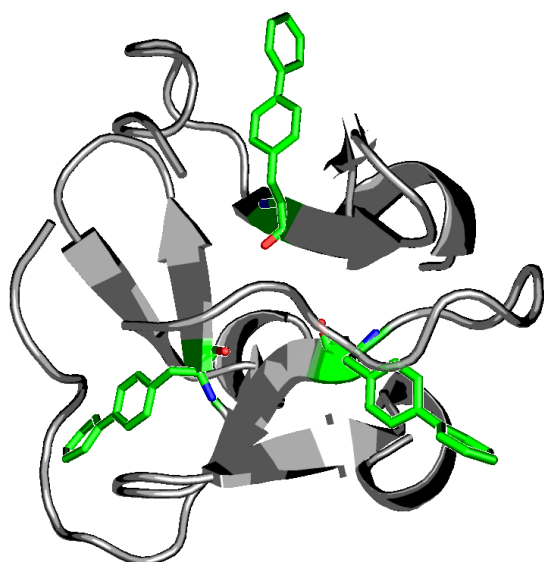
Tabelle 14. Übersicht der ^1H -NMR Verschiebungen in den unterschiedlichen β -hairpin Peptiden und die daraus berechnete Faltungspopulation (FP).

| Amino- säure | Asn-Gly $\delta(\text{C}_\alpha\text{H})$ [ppm] | Hot=Tap $\delta(\text{C}_\alpha\text{H})$ [ppm] | Hot=Tap $\delta(\text{C}_\alpha\text{H})$ [ppm] | | Asn-Gly $\delta(\text{C}_\alpha\text{H})$ [ppm] | |
|----------------------------|--|--|--|------------|--|------------|
| | X = Tyr | X = Tyr | X = Bip | X = 4IF | X = Bip | X = 4IF |
| | | | P63 | P62 | P61 | P60 |
| Ala ¹² | 4.20 | 4.19 | 4.08 | 4.05 | 4.11 | 4.09 |
| Xaa ¹³ | 5.15 | 5.28 | 5.42 | 5.33 | 5.29 | 5.20 |
| Val ¹⁴ | 4.62 | 4.76 | 4.76 | 4.76 | 4.62 | 4.59 |
| Arg ¹⁵ | 4.45 | 4.16 | 4.06 | 4.23 | 4.35 | 4.46 |
| Lys ¹⁶ | 4.42 | 4.45 | 4.44 | 4.47 | 4.40 | 4.40 |
| Glu ¹⁹ | 4.60 | 4.76 | 4.80 | 4.76 | 4.56 | 4.60 |
| Trp ²⁰ | 5.01 | 5.10 | 5.21 | 5.09 | 5.04 | 5.02 |
| Val ²¹ | 4.55 | 4.64 | 4.73 | 4.74 | 4.57 | 4.52 |
| Leu ²² | 4.19 | 4.17 | 4.22 | 4.17 | 4.22 | 4.13 |
| Leu ²³ | 4.46 | 4.41 | 4.48 | 4.45 | 4.46 | 4.42 |
| Ser ²⁴ | 4.50 | 4.52 | 4.35 | 4.25 | 4.37 | 4.37 |
| Σ | 4.56 | 4.58 | 4.60 | 4.57 | 4.56 | 4.53 |
| FP | 93% | 100% | 107% | 97% | 93% | 83% |

Aus den Ergebnissen der vorangehenden Tabelle geht hervor, dass alle synthetisierten β -hairpin Peptide mit 4IF- bzw. Bip-Mutation eine sehr hohe Faltungspopulation aufweisen, verglichen mit der nativen Sequenz mit Tyrosin (93%). Im Falle des β -hairpins **P63** mit Hot=Tap-turn und Bip-Mutation wurde sogar ein höherer relativer FP-Wert berechnet, verglichen mit der 100% Referenz. Diese Feststellung deutet darauf hin, dass die Bip-Mutation generell einen stabilisierenden Effekt auf die Struktur hat, speziell im Fall des Hot=Tap Peptids. Eine solche Tendenz ließ sich bereits anhand der δ -Leucin Signale aus dem aliphatischen Bereich der ^1H -NMR-Spektren erkennen und liefert somit eine weitestgehend konsistente Aussage mit der Berechnung der relativen Faltungspopulation aus den $\delta(\text{C}_\alpha\text{H})$ -Werten. Ohnehin kann ein großer Einfluss des gegenüberstehenden, modifizierten Tyrosins auf die δ -Leucin-Signale an Position 22 beobachtet werden, welcher im Falle der Bip-Mutationen stets größer ist, als bei den 4IF-Mutanten. Die daraus resultierende, z. T. deutliche Hochfeld Verschiebung der δ -Leucin²²

Signale spricht daher, im Speziellen für den Bip-Baustein, für einen stabilisierenden Effekt durch den zusätzlichen Phenyl-Rest.

Zusätzlich zu den β -hairpins wurde eine Foldon-Sequenz synthetisiert, welche einen Asn-Gly-turn und die Bip-Mutation an Position 13 enthielt (**P71**). Anhand von bereits vorhandenen Kristallstrukturen (PDB-Code: 2WW7)^[315] konnte ein Strukturvorschlag für das trimere Foldon mit der Bip-Mutation anstelle des Tyrosins erstellt werden (Abb. 105).



Foldon-Sequenz (1-27):

KYIPEAPRNGEABipVRKNGEWVLLSTFL

Abbildung 105 Computergestützte Simulation des trimeren Foldons mit Bip-Mutation an Position 13 auf Basis der Kristallstruktur mit dem PDB-Code: 2WW7.^[315]

Mithilfe von ^1H -NMR-Spektren, die von 300-360 K in 10 K Schritten gemessen wurden, sollte die Stabilität des Foldons verglichen mit dem entsprechenden β -hairpin **P61**, überprüft werden. Weiterhin wurde nach Anhaltspunkten gesucht, die ein Vorkommen des Foldons als Trimer bestätigen. Die Messungen erfolgten in wässrigem Kaliumphosphatpuffer bei pH 3 und wurden in Anlehnung an die Dissertation von DR. MATTHIAS KÖRLING speziell auf die Leu^{22} C_δH -Verschiebungen untersucht, anhand derer eine Einschätzung des Schmelzverhaltens bzw. der Stabilität getroffen werden kann.^[312] Abbildung 106 zeigt die Gegenüberstellung der gemessenen Temperaturreihen (300-360 K) des β -hairpins **P61** und des Foldons **P71**.

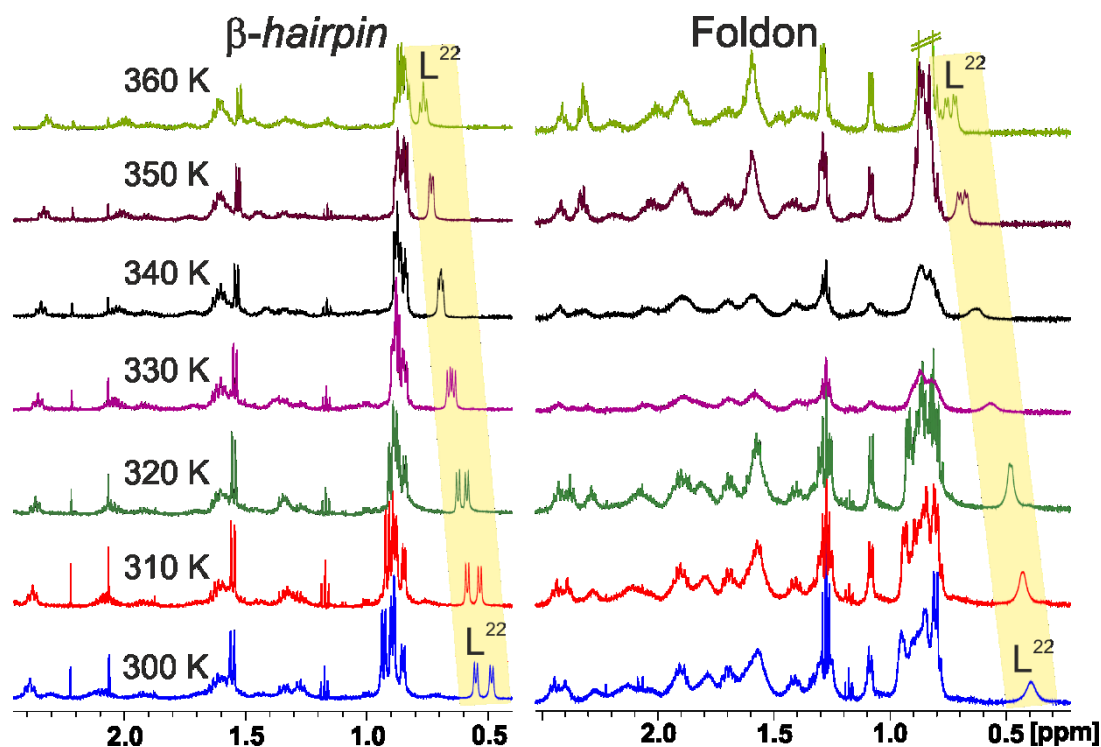


Abbildung 106. Gegenüberstellung der ^1H -NMR-Spektren des β -hairpins P61 und des Foldons P71, gemessen mit Temperaturgradient von 300-360 K (500 MHz, Phosphatpuffer/ D_2O 9:1, pH = 3). Farbige hinterlegt sind die beiden δ -Leu 22 Signale, welche eine starke Temperaturabhängigkeit zeigen.

Die beiden δ -Leu 22 Signale zeigen eine starke Temperaturabhängigkeit verglichen mit den anderen Protonen im aliphatischen Bereich. Aufgrund der Nähe der δ -Leu 22 CH_3 -Gruppen zum gegenüberliegenden aromatischen Rest des Tyrosins 13 (bzw. hier Bip) im gefalteten Zustand, wirkt sich der Ringstromeffekt auf die beiden δ -Leu 22 CH_3 -Gruppen aus und bewirkt die charakteristische Hochfeldverschiebung. Im Zuge der Entfaltung wird dieser Effekt durch die räumliche Trennung verringert, sodass die beiden δ -Leu 22 Signale in das Tieffeld wandern.^[312] Bereits DR. BJÖRN ECKHARDT und DR. MATTHIAS KÖRLING beschrieben die Position der δ -Leu 22 Signale als charakteristisches Indiz für die Stabilität des β -hairpins.^[312,315] Die temperaturabhängige Tieffeldverschiebung kann auch hier beobachtet werden, jedoch bewegt sich diese, verglichen mit den Werten aus der Dissertation von DR. MATTHIAS KÖRLING, in einem kleineren ppm-Bereich, was auf eine höhere Stabilität der Peptide mit Bip-Mutation hindeutet. Die zu beobachtende diastereotopie Aufspaltung der δ -Leu 22 Signale bei steigender Temperatur wurde von DR. MATTHIAS KÖRLING bereits dahingehend gedeutet, dass durch die erhöhte Dynamik der Abstand zwischen den Seitenketten im zeitlichen Mittel verringert wird, wodurch der Ringstromeffekt des Tyr 13 (bzw. Bip) einen größeren Einfluss hat.^[312]

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung von Bisubstrat-Inhibitoren beinhaltet Aspekte der beiden Methoden der Fragment-basierten Wirkstoffsynthese und der Übergangszustand-analogen Inhibitor-Synthese. Zwei Fragmente, die z.B. über einen Linker miteinander verknüpft werden, ahmen die natürlichen Substrate und gleichzeitig die synthetischen Inhibitoren eines Enzyms nach und sollen durch die Doppeladressierung für mehr Wechselwirkungen mit diesem sorgen. Darüber hinaus bietet die dadurch erhoffte Steigerung der Selektivität für ein spezielles Enzym einen Vorteil gegenüber einfachen Inhibitoren, deren Spezifität sich nicht nur auf eine bestimmte Proteinkinase beschränken lässt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der Entwicklung von Bisubstrat-Inhibitoren ein weiterer Aspekt in diesem Kontext erstrebt. So sollte trotz der Verfolgung einer höheren Selektivität der synthetisierten Bisubstrat-Inhibitoren über die Verwendung von kovalent reversibler Chemie die Übertragbarkeit auf andere Kinasen erleichtert werden, da häufig sehr große Ähnlichkeiten zwischen den Inhibitoren verschiedener Kinasen bestehen. Daraus resultierend wurde auf eine Verknüpfung des Substrats mit dem Inhibitor im Vorfeld verzichtet, sondern auf ein „Finden“ während der Kristallisation, aufgrund der räumlichen Nähe im Protein und der Affinität der beiden Komponenten zueinander, aufgebaut. Es sollte demnach festgestellt werden, ob der entropische Gewinn des freiwerdenden Wassers im Zuge der reversiblen Bindungsknüpfung zwischen dem Diol und der Boronsäure dafür sorgt, dass eine Veresterung in wässriger Umgebung stattfinden kann. Abbildung 107. zeigt das generelle Konzept, welches in dieser Arbeit verfolgt wurde.

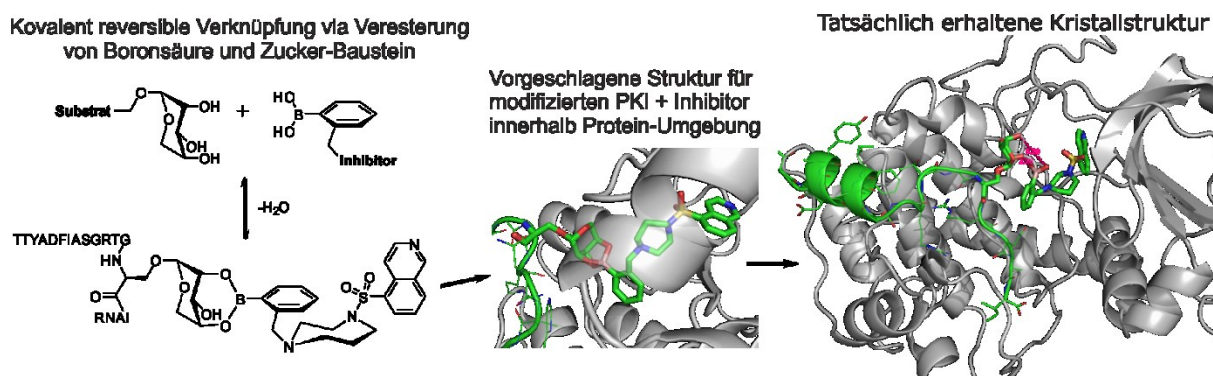
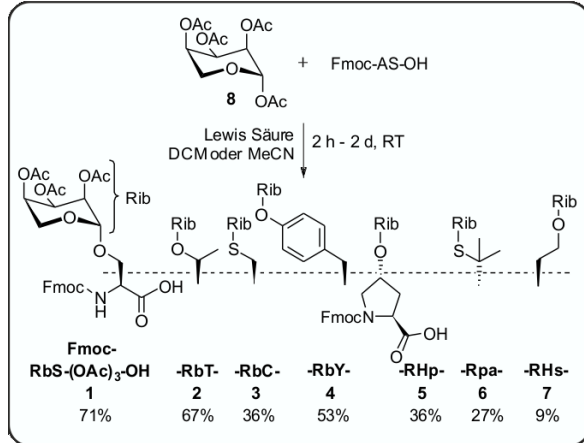


Abbildung 107. Überblick über den Verlauf des Konzepts dieser Arbeit. Die Idee der kovalent reversiblen Verknüpfung des Boronsäure-modifizierten Inhibitors mit dem Zucker-enthaltenden Substrat über eine Veresterung beider Komponenten (links) sollte über den Energiegewinn des freiwerdenden Wassers bei der Bindungsbildung zur mittig gezeigten Struktur führen. Tatsächlich konnte jedoch gezeigt werden, dass die räumliche Struktur im Protein keine Verknüpfung zulässt (rechte Kristallstruktur).

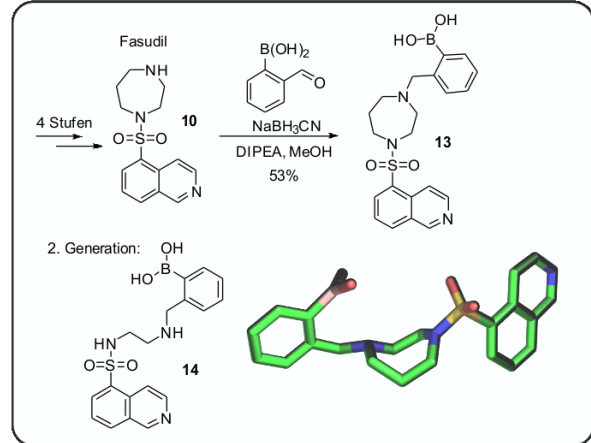
Bevor jedoch Kristallisationsansätze und Affinitäts-Tests mit solchen Bisubstrat-Inhibitoren durchgeführt werden konnten, welche in Kooperation mit dem AK KLEBE aus der pharmazeutischen Chemie stattfanden, mussten brauchbare Bausteine für die Verknüpfung beider Komponenten synthetisiert werden. Dies geschah in Anlehnung an computerbasierten Berechnungen unter Zuhilfenahme bereits vorhandener Kristallstrukturen der PKA. Zunächst erfolgte die Synthese verschiedener ribopyranosylierter Aminosäure Bausteine, indem Aminosäuren mit Hydroxy- und Thiol-Funktionen in der Seitenkette über unterschiedliche, Lewis-Säure vermittelte Glykosylierungsreaktionen mit der Tetraacetyl-geschützten Ribopyranose umgesetzt wurden (RAS). Dabei konnten insgesamt sieben verschiedene RAS-Bausteine (**1-7**) in z. T. guten Ausbeuten erhalten werden. Die Ausbeuten der jeweiligen Synthesen lagen bei allen Bausteinen in einem Bereich, der es ermöglichte, diese sowohl in der manuellen als auch in der automatisierten Festphasenpeptidsynthese einzusetzen. Die Übertragbarkeit des Einbaus der RAS-Bausteine von kurzen Test-Sequenzen auf größere Peptide war problemlos möglich, sodass mehrere PKI-Sequenzen, mit RAS-Mutationen an verschiedenen Stellen in der Nähe des aktiven Zentrums, synthetisiert werden konnten. Für die Synthese des Inhibitors wurde die Struktur des Fasudils® als Leitmotiv gewählt, da dieses bereits als Inhibitor mit einem K_D -Wert im nanomolaren Bereich bekannt ist. Daher wurden zunächst vereinfachte Sulfonamid-Bausteine synthetisiert, um die generelle Verknüpfbarkeit mit Boronsäuren zu untersuchen. Beginnend mit einem System, bei welchem die Verknüpfung des Inhibitors mit der Formylphenylboronsäure über dessen Iminierung mit einem freien Amin stattfand, wurde letztlich auf eine stabilere Verknüpfung der beiden Komponenten umgestiegen, die auf der reduktiven Aminierung der Formylphenylboronsäure mit den entsprechenden primären und sekundären Aminen beruhte. Somit konnte auch die zweite Komponente in verschiedenen Ausführungen erfolgreich synthetisiert werden, sodass anschließend die Veresterung der Zuckerbausteine mit der Boronsäure erfolgen konnte. Diese Verknüpfung wurde im Vorfeld testweise mit jedem RAS-Baustein (in Form eines entsprechenden Tetrapeptids **P1-P6**) mit Pyrenboronsäure im NMR-Maßstab in DMSO-d_6 durchgeführt, sodass aufgrund der geringeren Komplexität der aufgenommenen NMR-Spektren genaue Studien zum Bindungsmodus und der Stabilität mit den jeweiligen RAS-Bausteinen angestellt werden konnten. Schließlich erfolgte die Übertragung der Verknüpfungsexperimente auf das Bisubstrat-Inhibitor-System der PKA im wässrigen Puffer, durch welche sich Kristallstrukturen erhofft wurden, in denen eine erfolgte Veresterung zu beobachten wäre. Tatsächlich jedoch wurden Kristallstrukturen erhalten, in denen keine Verknüpfung zu sehen war, da die Abstände beider Komponenten zueinander zu

groß waren (siehe PDB-Codes: unveröffentlichte Dissertation JANIS MÜLLER). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Experimente mit dem Fasudil zweiter Generation erhalten.

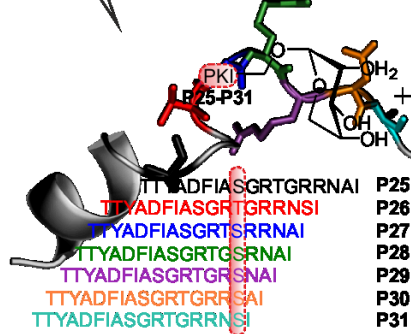
Synthese der glykosylierten Aminosäuren



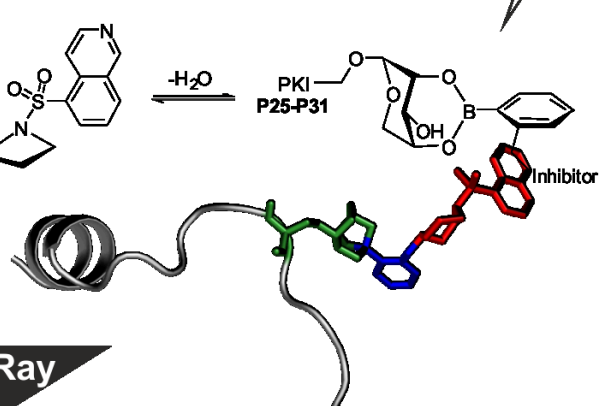
Fasudil-basiertes Inhibitor-Design



Peptidsynthese der PKI-Sequenz



Kovalent reversible Verknüpfung



X-Ray

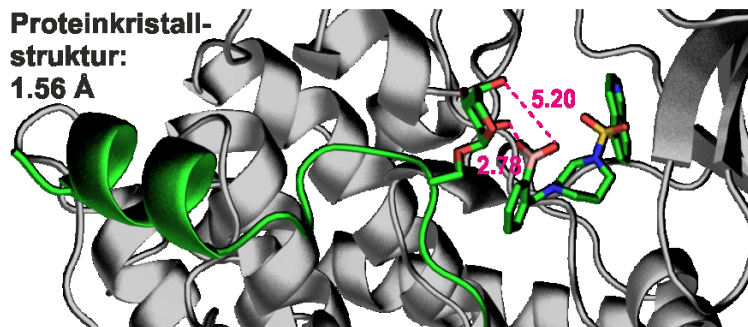


Abbildung 108. Die beiden Syntheserouten zur Herstellung der RAS-Bausteine und der „Borono-Fasudile“ lieferten die gewünschten Produkte zwar in hoher Reinheit, die Ausbeuten sind jedoch z.T. optimierungsbedürftig. Der Einbau der RAS-Bausteine in die PKI-Sequenz erfolgte mittels automatisierter Festphasenpeptidsynthese an verschiedenen Positionen. Vereinigung beider Komponenten im NMR-Maßstab in DMSO führte zur kovalent reversiblen Veresterung der Boronsäure mit der Zucker-Einheit. Die Kristallisationsansätze der modifizierten PKI-Sequenzen mit dem Protein in wässrigen Puffer-Systemen zeigten jedoch keine Veresterung.

Anhand der Kristallstrukturen konnte bestätigt werden, dass in Protein-Umgebung keine Verknüpfung der Zucker-Komponente mit dem Boronsäure-modifizierten Inhibitor stattgefunden hat, da sich die entsprechenden, für die Veresterung benötigten funktionellen Gruppen nicht nah genug kommen und wahrscheinlich auch das umgebende Protein die Beweglichkeit der beiden Komponenten beeinträchtigt. Somit bedarf es der weiteren Optimierung des Systems, wobei das größere Potential im Boronsäure-Baustein zu finden sein dürfte, da dieser mehr Möglichkeiten für eine Modifizierung bereithält. Ein Wechsel der Ribose gegen einen anderen Zucker im Aminosäure-Baustein käme ebenfalls in Frage (Versuche mit Fructose wurden durchgeführt), jedoch wäre mit Auswirkungen auf die allgemeine Syntheseroute zu rechnen, da eventuell andere Schutzgruppen am Zucker und der Aminosäure oder andere Glykosylierungs-Methoden von Nöten wären. Generell konnte jedoch gezeigt werden, dass die PKI-Sequenz die Mutation mit einem RAS-Baustein an vielen Positionen relativ gut toleriert, da die erhaltenen K_D -Werte nicht für einen völligen Verlust der Affinität sprechen (außer bei PKI **P28**). Zu diesem Zeitpunkt waren jedoch die Kristallisationsversuche und Affinitätsmessungen noch nicht vollständig abgeschlossen, sodass noch einige Ergebnisse ausstehen.

In weiterführenden Arbeiten müsste das System kompatibel für eine Umsetzung im wässrigen Milieu gemacht werden, da zwar die Reaktivität in DMSO_{d6} sehr hoch ist, in Wasser jedoch mit den verwendeten Komponenten nicht bestätigt werden konnte. Da jedoch eine Verknüpfung im Protein und somit in Puffer bzw. Wasser gewünscht ist, muss eine Optimierung der beiden Verknüpfungs-Komponenten erfolgen, die eine Übertragung der Reaktion in das wässrige System ermöglicht. Dies macht jedoch den Wechsel zu einem anderen Zucker unumgänglich, da in zahlreichen Experimenten gezeigt werden konnte, dass die pyranoid Form der Ribose in Wasser keine Umsetzung mit Boronsäuren zeigt, selbst bei Verwendung des, ausschließlich in Wasser reagierenden, Benzoboroxols.

Weiterhin wurden auch andere Peptidsequenzen auf ihre Toleranz gegenüber RAS-Bausteinen getestet und ein Versuch gestartet, über den gleichzeitigen Einbau von Boronsäure und RAS-Baustein in ein Peptid eine intramolekulare Zyklisierung hervorzurufen. Der β -*hairpin* des Foldons zum Beispiel tolerierte die RbS-Mutationen sehr gut, da sowohl die einfache, als auch die doppelte RbS-Einbindung hohe Werte für die relative Faltungspopulation lieferten. Auch die Filaggrin Peptide mit Mutationen der beiden Serine gegen RbS bzw. des Threonins gegen RbT konnten mittels ELISA-Test positiv auf ihre Affinität gegenüber Autoantikörper rheumatoider Arthritis getestet werden. Die Versuche zur intramolekularen Zyklisierung über verschiedene Boronsäuren mit dem RbS-Baustein in diversen Heptapeptiden bzw. letztlich im β -*hairpin* des Foldons zeigten alle eine gewünschte Umsetzung zum zyklischen Produkt, jedoch

konnte zumeist kein vollständiger Umsatz beobachtet werden. Generell erscheint die Methode jedoch geeignet, eine intramolekulare Zyklisierung in Peptiden einzuleiten. Ein ähnlicher Ansatz beinhaltete die Bildung von Makromolekülen über die Verknüpfung von Peptiden, von denen eines eine Boronsäure enthält und ein weiteres einen RAS-Baustein. Das getestete System, bestehend aus einem Ausschnitt aus der A β -Sequenz von Prionen-Peptiden (mit einer gekuppelten Boronsäure an die Seitenkette eines Lysins) und einem Ausschnitt aus der PKI-Sequenz (mit RbS Mutation), lieferte ebenfalls die gewünschte Verknüpfung, was mittels NMR Spektroskopie gezeigt werden konnte. Somit gelang der Zusammenschluss zweier Peptide zu einem Peptid mit einem Molekulargewicht > 3000 g/mol schlichtweg durch das Vereinen beider Peptide in einem NMR-Röhrchen in DMSO_{d6}.

Beide letztgenannten Methoden bergen noch viel Potential für die Synthese zyklischer Peptide und die Generierung von Makromolekülen, da der Einbau der benötigten Verknüpfungskomponenten während der Festphasenpeptidsynthese sehr leicht handhabbar ist und es sich bei der stattfindenden Veresterung um ein generell reversibles Verknüpfungssystem handelt.

Ein weiteres verfolgtes Projekt war die Synthese von Phenylalanin-Derivaten mittels MIYAUURA-Borylierung über die Verwendung von Arylboronsäure-Verbindungen. Dabei konnten zwei Aminosäure Bausteine (4-Iod-Phenylalanin und 4,4'-Biphenylalanin) erfolgreich synthetisiert und zunächst in den β -*hairpin* des Foldons und anschließend in die Foldon-Sequenz integriert werden. Anschließende NMR-spektroskopische Untersuchungen ergaben z. T. eine gesteigerte Stabilität der β -*hairpin* Struktur verglichen mit der nativen Sequenz, sodass auch auf diesem Gebiet Potential für weitere Experimente mit den genannten Aminosäure Bausteinen zu finden ist.

5. Summary and Outlook

The development of bisubstrate inhibitors covers the aspect of the methods of fragment-based drug design as well as the transition state analog inhibitor synthesis. Two fragments, which are e. g. connected by a linker, simultaneously mimicking the natural substrates or inhibitors of an enzyme to increase the interactions by double addressing of both binding sites. Furthermore the intended increase of selectivity for a certain enzyme by using bisubstrate inhibitors has the advantage of a more specific binding to a certain protein kinase compared to the use of easier inhibitors. In this study, the development of such bisubstrate inhibitors was one aspect that was taken care of. Another aspect with opposing intentions concerning the increase of selectivity of the inhibitor was the use of covalent reversible chemistry for the linkage of both substrates/inhibitors to give the chance of transferability to other kinases, because inhibitors for different kinases usually bear huge similarities among each other. As a result the linkage between the substrate and the inhibitor was not incorporated in advance but they were intended to “find each other” during crystallization approach through their sterical proximity and affinity reasons. It was thought to find out, if the entropical gain caused by the release of water during the reaction of the diol and the boronic acid can overcome the unfavored esterification under aqueous conditions. An overview of the general concept of this study is shown in figure 109.

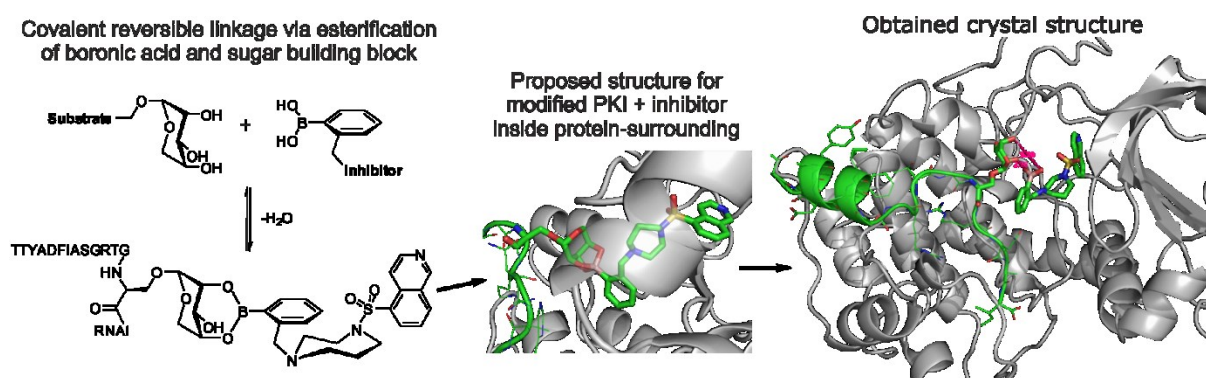


Figure 109. Overview of the conceptual process of this study. The idea of the covalent reversible linkage of the boronic acid modified inhibitor with the sugar-containing substrate via esterification of both components (left) was supposed to lead to the centrally shown structure driven by the energetic gain of releasing water molecules. As a matter of fact the sterical appearance of both components inside the protein environment does not allow the linkage via esterification (right).

Prior to performing crystallization approaches and affinity tests with these bisubstrate inhibitors in the pharmaceutical department in the working group of Prof. KLEBE, suitable building blocks that form the linkage between them, had to be synthesized. This was done in dependence on the computer based calculations with the aid of already measured crystal structures of PKA. First

the syntheses of different ribopyranosylated amino acid building blocks were performed by using amino acids bearing several hydroxy- and thiol-functions in the side chain as well as tetraacetyl protected ribopyranose, putting them together through lewis acid mediated glycosylation reactions. In this manner a total of six different RAA building blocks (**1-7**) with partially good yields have been synthesized. The yields received in the respective syntheses were all providing enough product to be able to use it in manual as well as in automatic solid phase synthesis. Furthermore the transfer of the conditions used for the RAA-incorporation into short test-peptides to larger peptides was easily manageable, so several PKI peptides bearing RAA mutations at different positions near the active side were synthesized. For the synthesis of the inhibitor, Fasudil® was being used as chemical lead because of known K_D -values for this inhibitor in a nanomolar range. Therefore simplified sulfonamide building blocks were initially synthesized to study their general ability for being linked to boronic acids. Beginning with a system where the linkage of the inhibitor was performed with the aldehyde function in formylphenylboronic acid via its imination with a free amine, the reaction was switched to another one providing a more stable linkage. Henceforth the linkage was being introduced by the reductive amination of formylphenylboronic acid with the corresponding primary or secondary amine. With this the second building block - the “borono-fasudil” with different variations was successfully finished and available for esterification reactions with the sugar building blocks. The linkage tendency with boronic acids was tested with each RAA building block in advance (using the corresponding tetrapeptides **P1-P6**) using pyrenboronic acid on a NMR scale in DMSO-d_6 . This was done to receive NMR spectra with lower complexity enabling detailed studies of the binding mode and the stability of each RAA building block linked to boronic acid. Finally the transfer of the linkage-experiments to the bisubstrate-inhibitor-system of the PKA in aqueous buffer was arranged, hoping for the formation of crystals to observe the esterification product. As a matter of fact crystal structures were received, which did not show the desired linkage but a distance between both components that could not be overcome by esterification (PDB-Codes: see unpublished dissertation JANIS MÜLLER). Similar results were obtained with the experiments with “borono-fasudil” of the second generation.

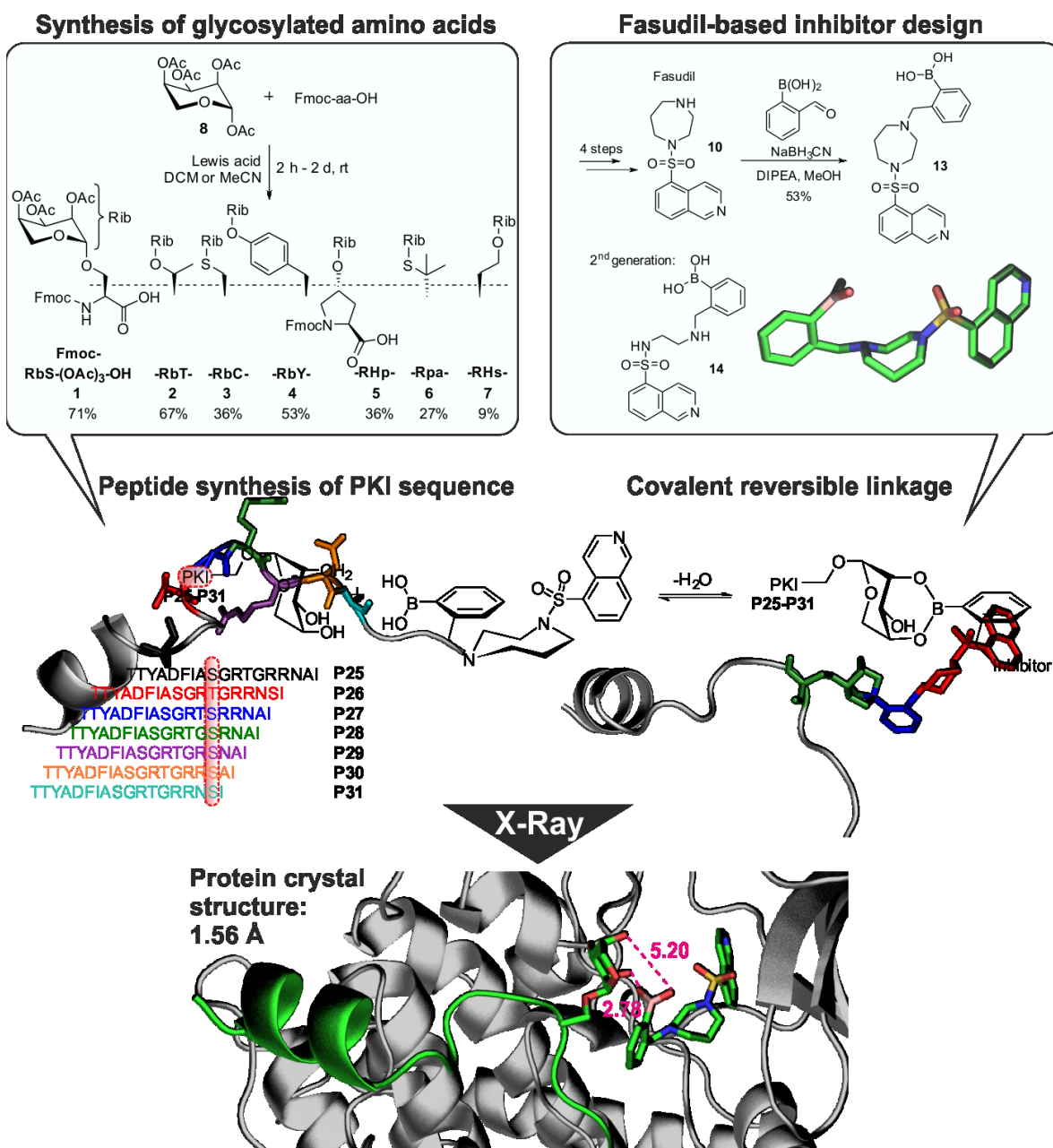


Figure 110. Both syntheses for the assembly of the RAA building blocks and the “borono-fasudil” derivatives provided the desired products with excellent purities but the yields mostly needed improvement. The incorporation of RAA building blocks into the PKI sequence was carried out via automated solid phase peptide synthesis at different positions. Combination of both components on a NMR scale in DMSO led to covalent reversible esterification of the boronic acid with the sugar moiety. Crystallization approaches of the modified PKI sequences with the protein using aqueous buffer systems did not show any esterification event.

The obtained crystal structures confirmed that no linkage between the sugar component and the boronic acid-modified inhibitor in the protein environment took place, because the participating functional groups are too far away from each other and the surrounding protein additionally decreases the mobility of both components. Consequently the examined system needs to be

optimized, where the boronic acid component would be the more promising starting point as it holds more options for modification. A change of the ribose residue in the amino acid building block against another sugar would also be possible (experiments using fructose were performed) but would probably have a major impact on the general synthesis. Other protecting groups for the sugar moiety and the amino acids might become necessary or even a change of the glycosylation method. What basically could be proven is the tolerance of PKI sequences for mutations with RAA building blocks at different positions, which could be indicated by the obtained K_D -values that still covered proper affinity ranges (except from PKI **P28**). At this time the crystallization approaches and affinity measurements had not been completely finished, therefore some results were still outstanding.

Further studies would require the transfer of the whole system to aqueous conditions. While the reactivity in DMSO_{d6} was assigned to be quite high, no reactivity could be seen for the esterification in water. Since the desired linkage has to be performed inside the protein and water/buffer respectively, the described system needs optimization of both components to that effect that a transfer of the reaction into an aqueous system is possible. Therefore the ribose moiety inevitably has to be changed to another sugar, because it was shown in numerous experiments that the pyranoid conformer of ribose does not react with boronic acids in water, even though benzoboroxols were used, which exceptionally react in water.

Moreover the tolerance of other peptide sequences referring to RAA building blocks were tested and experiments were initiated for the simultaneous incorporation of boronic acids and RAA building blocks into the same peptide for reasons of inducing intramolecular cyclisation. For example the β -*hairpin* of the foldon peptide showed a high tolerance for the incorporation of one as well as of two RbS-mutations into the peptide chain, which was indicated by high values for the folding population for both mutated peptides. Furthermore the filaggrin peptides having RbS mutations at both serine positions as well as the one with a RbT mutation at the threonine position showed positive results concerning their affinity towards autoantibodies of rheumatoid arthritis, which was observed with ELISA tests. The approach of intramolecular cyclisation reactions using different boronic acids with RbS building blocks in various heptapeptides and finally in β -*hairpin* peptides all showed the desired conversion leading to the cyclized products, but mostly with incomplete conversions. Generally spoken this method seems to be suitable to induce the intramolecular cyclisation in peptides. A similar approach covers the formation of macromolecules via the linkage of different peptides to each other. Therefore one of the peptides has to bear a boronic acid and another one a RAA building block. The tested system in this study consisted of a cutout of the A β sequence of prion peptides (with boronic acid

coupled to side chain of lysine) and a cutout of the PKI sequence (with RbS mutation), which also gave the desired linkage, proven by NMR spectroscopy. In this way the combination of two different peptides was accomplished providing a peptide with a molecular weight of > 3000 g/mol just by combining two peptides in a NMR tube in DMSO_{d6}.

Both last-mentioned methods contain plenty of potential for the synthesis of cyclic peptides and the formation of macromolecules, because of the easily feasible incorporation of the linking-components into the corresponding peptides during SPPS and the reversibility of the esterification reaction.

Another tracked project was the synthesis of phenylalanine derivatives via the MIYAURA-borylation using aryl boronic acid compounds. In doing so two amino acid building blocks (4-iodo phenylalanine and 4,4'-bisphenylalanine) were successfully synthesized and were incorporated into the β -*hairpin* of the foldon and afterwards into the foldon sequence. The following NMR spectroscopic analysis partly showed an increased stability for the β -*hairpin* structure compared to the native sequence, which gave this topic a lot of potential for further investigations on the incorporation of such amino acid building blocks into the foldon peptide.

6. Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Anmerkungen

Lösungsmittel und Reagenzien

Jegliche verwendete Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destillativ aufgereinigt, absolute Lösungsmittel nach den entsprechenden Standardmethoden getrocknet und über 3 Å Molsieb aufbewahrt.^[316] DMF und Piperidin für den Einsatz in der Peptidsynthese wurde in der Reinheit *peptide grade*, Acetonitril für den HPLC-Gebrauch in der Reinheit *HPLC grade* von *Iris Biotech* kommerziell erworben. Für die Wasseraufreinigung des für die HPLC benötigten Reinstwassers wurde eine *Thermo Scientific Barnstead MicroPure* Anlage verwendet. Alle übrigen kommerziell erhältlichen Reagenzien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt. Sofern Gebrauch von luft- oder feuchtigkeitsempfindlichen Reagenzien gemacht wurde, erfolgte zunächst das Ausheizen der Apparatur mit einem Heißluftfön unter Argon bzw. Stickstoffatmosphäre.

Dünnschichtchromatographie

Verwendet wurden Kieselgel 60 F₂₅₄ Aluminium-DC-Fertigplatten der Firma *Merck*. Die Detektion erfolgte entweder mit einer UV-Lampe mittels Fluoreszenzauslöschung bzw. UV-Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm oder unter Verwendung verschiedener Färbereagenzien. Die entwickelten DC-Platten wurden für die Farbreaktion in die jeweilige Anfärbelösung getaucht und mit einem Heißluftfön erhitzt.

Ninhydrin-Lösung: 350 mg Ninhydrin, 4.00 mL Eisessig, 100 mL *n*-Butanol

Mostain-Lösung: 0.40 g Cer(IV)sulfat, 20.0 g Ammoniummolybdat, 400 mL 10 %ige Schwefelsäure

Flash-Chromatographie

Die stationäre Phase bestand aus Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma *Merck*. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Stickstoff-Überdrucks.

Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Folgende Geräte wurden für die aufgenommenen NMR-Spektren verwendet:

- *Bruker AV II 300* für ^1H - (300.13 MHz) und ^{13}C - (75.4 MHz) Routinemessungen
- *Bruker DRX-500* und *Bruker AV III 500* für ^1H - (500.13 MHz), ^{13}C - (125.76 MHz) und 2D-Spektren in organischen Lösungsmitteln, sowie für Tieftemperaturmessungen bis $-80\text{ }^\circ\text{C}$ und Hochtemperaturmessungen bis $90\text{ }^\circ\text{C}$
- *Bruker AV 600* für ^1H - (600.13 MHz) und 2D-Spektren der Peptide mittels *WATER-GATE*-Pulssequenz zur Wasserunterdrückung bei Messungen in wässrigem Phosphatpuffer.

Messungen am DRX 500 wurden ausschließlich durch Mitarbeiter der NMR-Abteilung durchgeführt und die Experimente am AV 600 erfolgten zum Großteil durch eigene Messungen. Die Routinemessungen am AV 300 erfolgten durch einen automatischen Probenwechsler. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) und die chemischen Verschiebungen (δ) in *parts per million* (ppm) angegeben, letztere wurden aus der Mitte des Kopplungsmusters abgelesen. Das Resonanzsignal des verwendeten Lösungsmittels diente als interner Standard (DMSO-d_6 : ^1H : $\delta = 2.50\text{ ppm}$, ^{13}C : $\delta = 39.52\text{ ppm}$, CDCl_3 : ^1H : $\delta = 7.26\text{ ppm}$, ^{13}C : $\delta = 77.16\text{ ppm}$). Messungen, die in Phosphatpuffer/ D_2O (9:1) durchgeführt wurden, enthielten TSP-d_4 als Standard (Resonanzsignal ^1H : $\delta = 0.00\text{ ppm}$).

Alle angegebenen Multiplizitäten sind phänomenologisch, d.h. sie entsprechen nicht der theoretisch erwarteten Multiplizität, sondern der tatsächlichen Erscheinung des Signals im Spektrum. Es wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, m = Multiplett, dd = Dublett eines Dubletts, ddd = Dublett eines Doppeldubletts. Sofern eine Zuordnung der diastereotopen Protonenpaare nicht möglich war, wurden diese entsprechend mit $\text{CH}_{\text{diast.}}$ gekennzeichnet. Enthielten die abgebildeten Spektren Lösungsmittelsignale oder Resonanzsignale des Wassers, so wurden diese nicht beschriftet ($\delta = 3.33\text{ ppm}$ für Wasser in DMSO-d_6). Mithilfe von 2D-Experimenten (COSY, TOCSY, NOESY/ROESY, HSQC) erfolgte die korrekte Zuordnung der Protonensignale.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden an einem *Finnigan LTQ-FT* Massenspektrometer der Firma *Thermo Fisher Scientific* durch die Mitarbeiter der massenspektrometrischen Abteilung aufgenommen. Für sämtliche gemessenen Spektren wurde die Elektrospray-Ionisations-Methode (ESI) verwendet. Alle angegebenen Werte sind Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse und entsprechen stets den Massen der Isotope mit der größten natürlichen Häufigkeit. Zusätzlich

wurden Peptide mit einer Molekülmasse ab 2 kDa mittels der Kopplungstechnik HPLC-MS detektiert (*Agilent 1100 Series*).

UV/Vis-Spektroskopie

Mithilfe eines UV/Vis-Spektrometers *DU 800* der Firma *Beckman Coulter* wurde die Harzbeladung durch die Absorption der Abspalllösung in PE-Einmalküvetten ($d = 1.0$ cm) ermittelt. Zur Messung der UV/Vis-Spektren der Boronsäureveresterung wurde ein *Thermo Scientific Multiskan Go* Gerät verwendet. Es wurde von 300-600 nm in einer 96-well Mikrotiterplatte der Firma *Brand* gemessen.

CD-Spektroskopie

Für die Bestimmung der CD-Absorption wurde ein *JASCO J-810* CD-Spektrometer mit einer *HELMA 110-QS* Quarzglasküvette ($d = 0.2$ cm) verwendet. Die Messungen wurden mit einer Bandweite von 1 nm, einer Ansprechzeit von 8 s und einer Datenaufnahmegeschwindigkeit von 10 nm/min durchgeführt und jeweils dreimal wiederholt. Die Peptide wurden bei unterschiedlichen wässrigen Phosphatpuffer-Konzentrationen gelöst und vermessen.

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-Messungen wurden entweder an einer *Summit*-Anlage der Firma *Dionex* mit einem DAD-Detektor und einer *P680 dual gradient pump* von *Dionex* oder an einer *UltiMate 3000 UHPLC+ focused* von *Thermo Scientific* durchgeführt. Für analytische Messungen wurde eine *ACE 3 C18*-Säule (3 μ m, 3 mm x 150 mm) und für semipräparative Trennungen eine *ACE 5 C18*-Säule (5 μ mm, 7.75 mm x 150 mm) verwendet und mittels *ASI-100* Autosampler injiziert. Die semipräparative Aufreinigung wurde an einer *UltiMate 3000 UHPLC+ focused* der Firma *Thermo Scientific* mit einer C18-Säule *VP125/21 Nucleodur C18 gravity* von *Macherey-Nagel* durchgeführt. Als Laufmittel dienten Mischungen aus A = Wasser + 0.1 % TFA und B = Acetonitril + 0.085 % TFA. Die verwendeten Gradienten sind der Beschreibung der jeweiligen Verbindung zu entnehmen. Die angegebenen Retentionszeiten t_R entsprechen der absoluten und nicht der Netto-Retentionszeit, da die Messungen ohne Totzeitmarker verliefen.

6.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Festphasenpeptidsynthese

Sowohl die manuelle als auch die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde mit 2-Chlortritylchlorid-Polystyrolharz (2-CTC, 200-400 mesh, 1 % DVB, Kapazität = 1.60 mmol/g bzw. 1.42 mmol/g) als Trägermaterial, basierend auf der Fmoc-Schutzgruppenstrategie in DMF durchgeführt. Die manuelle Peptidsynthese wurde bei Raumtemperatur in einer Umkehrfritte unter ständiger Durchmischung der Suspension im Argonstrom vollzogen. Auch das Waschen des Harzes nach jeder Peptidkupplung und Fmoc-Entschützung erfolgten bei Raumtemperatur. Es wurde 60 Minuten mit einem dreifachen Überschuss der Fmoc-Aminosäuren und Kupplungsreagenzien (HBTU, HOBt) gekuppelt, jedoch wurde die Aminosäuremenge im Falle selbst hergestellter Verbindungen auf 2 Äquivalente reduziert und die Reaktionszeit gegebenenfalls auf 1.5-2 h erhöht. Die automatisierte Peptidsynthese erfolgte bei 50 °C und einem fünffachen Überschuss der Aminosäure und Kupplungsreagenzien (Oxyma, DIC). Sofern nicht anders angegeben, wurden Ansatzgrößen von 0.10 mmol je Aminosäure gewählt. Im Folgenden wird auf beide Methoden nochmals explizit eingegangen.

6.2.1 Beladung des 2-Chlortritylchlorid-Harzes

In einer Glasfritte wurde eine definierte Menge des 2-Chlortritylchlorid-Harzes vorgelegt und 20 min in DMF gequellt. Nach Entfernen des DMF erfolgte die Zugabe von 1.00 eq der Fmoc-Aminosäure, gelöst in DMF und 6.00 eq DIPEA. Abhängig von der zu beladenen Aminosäure und der erwünschten Harzbeladung wurde die Suspension zwischen 30 und 120 min im Argonstrom durchmischt. Die Reaktionslösung wurde entfernt und sechsmal mit DMF gewaschen, bevor eine Mischung aus DCM/MeOH/DIPEA (80:15:5) für 30 min auf das Harz gegeben wurde, um nicht umgesetzte 2-Chlortritylchloridlinker zu *cappen*. Letzterer Vorgang wurde wiederholt und anschließend erfolgte je dreimaliges Waschen des Harzes mit DMF, MeOH und DCM. Zuletzt wurde das Harz *in vacuo* getrocknet und die Beladung mittels UV-Vis-Spektroskopie bestimmt. Dafür wurde eine definierte Menge des Harzes (1.00-2.00 mg) entnommen, mit 1.00 mL 25 %iger Piperidin-Lösung in DMF versetzt (zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe) und nach 30 min mit 5.00 mL MeOH aufgefüllt. Die Absorption des entstandenen Fluorenyl-Piperidin-Derivats wurde bei 289 und 300 nm detektiert und mithilfe der folgenden Gleichung konnte die Harzbeladung bestimmt werden:

$$B \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{E \cdot V [\text{mL}]}{\varepsilon \left[\frac{\text{mL}}{\text{mmol} \cdot \text{cm}} \cdot d [\text{cm}] \cdot m_{\text{Harz}} [\text{g}] \right]} \quad (\text{VI})$$

B = Harzbeladung, E = Extinktion, V = Gesamtvolumen, ε = Extinktionskoeffizient, d = Schichtdicke der Küvette, m = Masse des Harzes

Die erhaltene Harzbeladung lag stets in einem Bereich zwischen 0.40 und 0.85 mmol/g.

6.2.2 Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe

Nach dem Quellen des beladenen Harzes in DMF (10 min) wurde eine 25 %ige Piperidin-Lösung in DMF zunächst für 10 min und nach Entfernen der Lösung erneut für 15 min hinzugegeben. Es wurden 2.00 mL Lösung pro 100 μmol Peptid verwendet. Anschließend wurde je dreimal mit DMF, MeOH und DCM gewaschen.

6.2.3 Kupplung der Aminosäuren

Für die Aminosäure-Kupplung wurden 3.00 eq der jeweiligen Fmoc-Aminosäure in DMF gelöst und mit 3.00 eq HOBt versetzt. Anschließend wurden 3.00 eq HBTU und 8.00 eq DIPEA in DMF hinzugefügt und die Suspension für 60 min im Argonstrom durchmischt. Für jede Kupplung wurde eine Konzentration von 100 μmol Peptid pro 2.00 mL DMF gewählt. Nach Abfiltrieren der Reaktionslösung wurde das Harz je dreimal mit DMF, MeOH und DCM gewaschen und mittels Kaiser-Test konnte die Vollständigkeit der Reaktion überprüft und die Kupplung gegebenenfalls wiederholt werden. Es wurde entweder mit der nächsten Kupplung fortgefahren oder das Harz *in vacuo* zur Lagerung getrocknet. Für die Synthese einer Peptidsequenz wurden stets im Wechsel die Fmoc-Abspaltung und die Kupplung durchgeführt. Bei Verwendung einer selbst synthetisierten Aminosäure wurde die Kupplungszeit auf 90-120 min erhöht.

6.2.4 Abspaltung der OAc-Schutzgruppe an RAS-Bausteinen

Vor der Peptid-Abspaltung vom Harz wurde bei Vorhandensein von glykosylierten Aminosäurebausteinen die Acetylschutzgruppe des Zuckers an der festen Phase entfernt. Es wurde zweimal je 30 min mit einer 2 %igen NaOMe Lösung in MeOH im Argonstrom

durchmischt, bevor die Lösung abfiltriert und das Harz mit Wasser, Et₂O, dreimal mit DMF und sechsmal mit DCM gewaschen wurde.^[317]

6.2.5 Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen simultan zur Peptid-Abspaltung vom Harz

Nach abgeschlossener Synthese wurde das Peptid, im Falle von Peptiden mit ungeschützten Seitenketten, durch Zugabe von Trifluoressigsäure (95 % in Wasser - Abspalllösung A) für 60 min vom Harz gespalten. Bei Peptiden mit geschützten Seitenketten wurde eine Mischung aus TFA/Phenol/Wasser/TIPS (88:5:5:2 - Abspalllösung B) verwendet und für 3 h im Argonstrom durchmischt. Das Filtrat wurde anschließend in absolutem, gekühltem Diethylether ausgefällt und der Überstand nach dem Zentrifugieren abdekantiert. Der Niederschlag wurde erneut mit Diethylether versetzt und resuspendiert. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt, bevor der Rückstand *in vacuo* getrocknet wurde. Zuletzt wurde das Peptid in Wasser (gegebenenfalls unter Zugabe von Acetonitril) gelöst, in flüssigem Stickstoff eingefroren und an einem Gefriertrockner *Alpha 2-4 LD plus* der Firma *Christ* getrocknet.

6.2.6 Automatisierte Festphasenpeptidsynthese von Peptiden

Mithilfe eines *LibertyBlue* Peptidsynthesizers der Firma *CEM* konnten längere Peptide mit mikrowellenbeschleunigter Synthese innerhalb kürzerer Zeit und unter Lösungsmittelersparnis hergestellt werden. Das Standard-Protokoll für die Verwendung des 2-CTC-Harzes lautet wie folgt:

- Fmoc-Abspaltung: Piperidin (20 %ig in DMF, 0.1 % HOBt), T = 50 °C (30 W), 3 min
- Kupplung der Aminosäuren:
 - Aminosäuren außer Fmoc-Arg(Pbf)-OH und glykosylierte Bausteine:
DIC/Oxyma (je 5.00 eq), T = 50 °C (30 W), 10 min
 - Kupplung von Fmoc-Arg(Pbf)-OH und glykosylierte Bausteine:
DIC/Oxyma (je 5.00 eq), T = 25 °C (0 W), 25 min, T = 50 °C (30 W), 10 min
- Waschen: dreimal mit DMF nach jeweiliger Fmoc-Abspaltung

6.2.7 Oxidation von Cystein-haltigen Peptiden

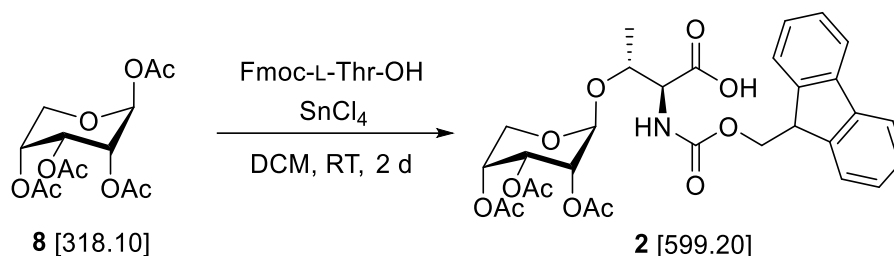
Die intramolekulare Disulfidbrückenbildung der synthetisierten Peptide wurde stets in Lösung durchgeführt. Hierfür wurde das abgespaltene und lyophilisierte Peptid in einem Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (10.0 mM, pH 7.4) aufgenommen und bei einer Konzentration von 0.10 mM in einem offenen Kolben durch Luftsauerstoff unter starkem Rühren 2-3 Tage von Cystein zu Cystin oxidiert. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels HPLC und nach vollständiger Umsetzung wurde die Reaktionslösung erneut lyophilisiert. Abschließend wurde das Rohpeptid über semipräparative HPLC aufgereinigt.

6.3 Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Boronsäureveresterung im NMR-Maßstab

Für die Boronsäureveresterung wurde das entsprechende glykosylierte Peptid im äquimolaren Maßstab zur jeweiligen Boronsäure eingewogen und in 0.60 mL DMSO_{d6} gelöst. Anschließend wurde die Probe zu mehreren Zeitpunkten NMR-spektroskopisch vermessen. Im Falle der konzentrationsabhängigen Boronsäuretitration wurden entsprechende Lösungen angesetzt und diese nach 10-20 minütiger Reaktionszeit NMR-spektroskopisch untersucht. Alle aufgeführten Boronsäureester wiesen die in den Positionen 2 und 4-veresterte Ribopyranose in der ¹C₄-Konformation als Hauptprodukt auf.

6.4 Synthese der Aminosäure-Bausteine und Verwendung in Tetrapeptiden

N-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*O*-((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4,5-triacetoxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-L-threonin-OH (Fmoc-RbT-OH, **2**)



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [g] | V [ml] |
|---------------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|-------|--------|
| D-Ribose-OAc (8) | 318.10 | - | 1.00 | 0.16 | 50.0 | - |
| Fmoc-L-Threonin-OH | 341.36 | - | 1.20 | 0.19 | 64.1 | - |
| SnCl ₄ | 260.53 | 2.23 | 2.00 | 0.32 | 82.0 | 0.04 |

Es wurden 50.0 mg (**8**, 0.16 mmol, 1.00 eq) D-Ribose-OAc in 2.00 mL DCM (abs.) gelöst und mit 36.8 μ L (0.32 mmol, 2.00 eq) SnCl₄ für 10 min gerührt. Nach Zugabe von 64.1 mg (0.19 mmol, 1.20 eq) Fmoc-L-Threonin-OH wurde unter DC-Kontrolle 2 d bei RT geführt. Anschließend wurde mit DCM verdünnt und mit halb-gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Die org. Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 10:1) konnten 62.9 mg (0.11 mmol, 67 %) eines gelben Schaums **2** erhalten werden.

¹H NMR: 600 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 12.95 (s, 1H, COOH), 7.89 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.76 (dd, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.9 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.47-7.42 (m, 1H, NH), 7.42 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.33 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 5.19 (t, ³J_{3-CH/2,4H} = 3.4 Hz, 1H, 3-CH), 5.02-5.01 (m, 1H, 4-CH), 4.92 (t, ³J_{2-CH/3H} = 3.5 Hz, ⁴J_{2-CH/4H} = 0.6 Hz, 1H, 2-CH), 4.91 (d, ³J_{1-CH/2H} = 3.8 Hz, 1H, 1-CH), 4.33-4.24 (m, 3H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 4.29 - 4.26 (m, 1H, β -CH₂), 4.17-4.15 (m, 1H, α -CH), 3.96 (dd,

Experimenteller Teil

$^3J_{5-proR-H/4H} = 2.3$ Hz, $^2J = 12.9$ Hz, 1H, 5-*proR*-CH₂), 3.64 (dd, $^3J_{5-proS-H/4H} = 3.4$ Hz, $^2J = 12.9$ Hz, 1H, 5-*proS*-CH₂), 2.07, 2.05, 1.94 (3x s, 9H, 3x OAc), 1.13 (d, $^3J_{\gamma-CH/\beta-H} = 6.3$ Hz, 3H, γ -CH₃).

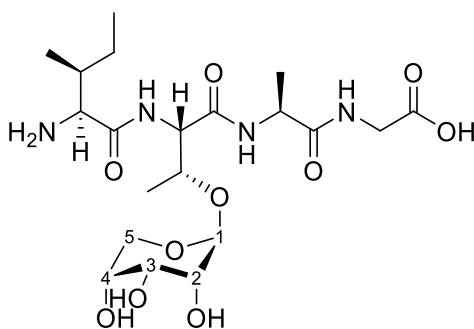
¹³C NMR: 150 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 169.9, 169.6, 169.2 (C=O), 156.6 (Fmoc-C=O), 143.8, 140.7 (C_q), 127.6, 127.1, 125.4, 120.1 (Fmoc-CH_{aromat.}), 94.5 (1-CH), 71.6 (β -CH), 67.7 (2-CH), 66.2 (4-CH), 65.9 (Fmoc-CH₂), 65.4 (3-CH), 60.6 (5-CH₂), 58.5 (α -CH), 46.7 (Fmoc-CH), 20.7, 20.6, 20.5 (OAc), 15.4 (γ -CH₃).

HR-MS (ESI): für C₃₀H₃₃NO₁₂Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 622.1900, gef.: 622.1895.

DC: R_f = 0.17 (DCM/MeOH 10:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3381, 2937, 1737, 1516, 1445, 1371, 1222, 1134, 1052, 976, 900, 737, 595, 540, 488, 421$ cm⁻¹.

Synthese des Tetrapeptids Ile-RbT-Ala-Gly (P2)



Das Peptid **P2** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptidsynthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc- und OAc-Schutzgruppen erfolgte die Abspaltung vom Harz mit wässriger TFA (95 %ig).

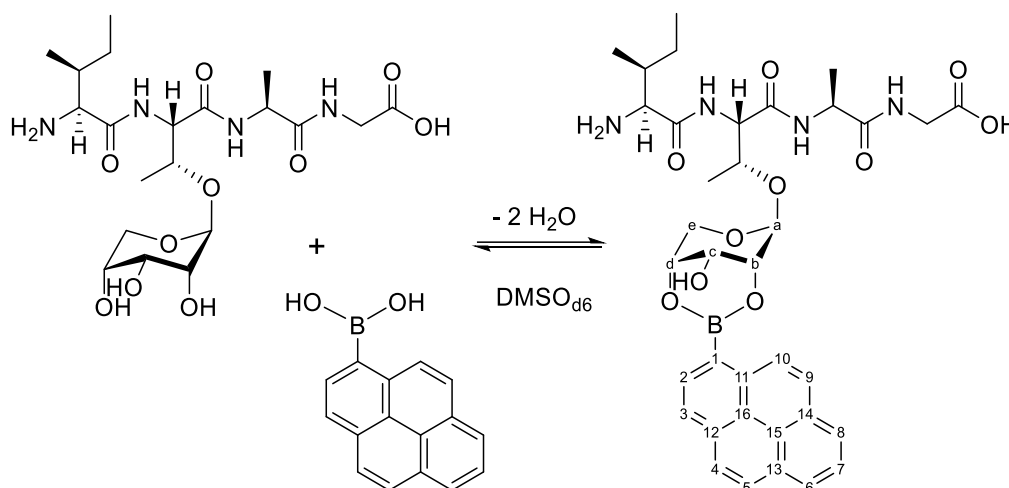
¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 12.54 (s, 1H, COOH), 8.32 (d, $^3J_{\text{NH-RbT}/\alpha\text{-H}} = 8.6$ Hz, 1H, NH-RbT), 8.16 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.9$ Hz, 1H, NH-Gly), 8.04 (bs, 2H, NH₂-Ile), 7.94 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.4$ Hz, 1H, NH-Ala), 4.87 (d, $^3J_{4\text{-OH}/4\text{H}} = 5.1$ Hz, 1H, 4-OH), 4.86 (d, $^3J_{3\text{-OH}/3\text{H}} = 5.5$ Hz, 1H, 3-OH), 4.73 (d, $^3J_{2\text{-OH}/2\text{H}} = 5.6$ Hz, 1H, 2-OH), 4.68 (d, $^3J_{1\text{H}/2\text{H}} = 4.4$ Hz, 1H, 1-CH), 4.52 (dd, $^3J_{\alpha\text{-RbT}/\beta\text{-H}} = 3.8$ Hz, $^3J_{\alpha\text{-RbT}/\text{NH}} = 8.6$ Hz, 1H, α -RbT), 4.34 (quin., $^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H}} = 7.2$ Hz, 1H, α -Ala), 4.11 (dd, $^3J_{\beta\text{-RbT}/\alpha\text{-H}} = 3.8$ Hz, $^3J_{\beta\text{-RbT}/\gamma\text{-H}} = 6.3$ Hz, 1H, β -RbT), 3.83-3.80 (m, 1H, α -Ile), 3.79, 3.72 (2x dd, $^3J_{\text{CH}_2\text{-Gly}/\text{NH}} = 5.9$ Hz, $^2J = 17.6$ Hz, 2H, α -Gly), 3.71-3.69 (m, 1H, 3-CH), 3.57-3.56 (m, 1H, 4-CH), 3.57 (dd, $^3J_{5\text{-proR-RbT}/\alpha\text{-H}} = 3.0$ Hz, $^2J = 12.1$ Hz, 1H, 5-*proR*-RbT), 3.46 (dd, $^3J_{5\text{-proS-RbT}/\alpha\text{-H}} = 6.3$ Hz, $^2J = 12.1$ Hz, 1H, 5-*proS*-RbT), 3.38-3.35 (m, 1H, 2-CH), 1.85-1.80 (m, 1H, β -Ile), 1.52-1.47, 1.16-1.12 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.22 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala), 1.11 (d, $^3J_{\gamma\text{-RbT}/\beta\text{-H}} = 6.3$ Hz, 3H, γ -RbT), 0.92 (d, $^3J_{\delta\text{Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 6.9$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.86 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.3$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

¹³C NMR: (125 MHz, 300 K, DMSO_{d6}) δ [ppm] = 172.1, 170.9, 168.0 (C=O), 157.5 (C_q), 97.2 (1-CH), 71.2 (β -RbT), 70.7 (2-CH), 68.5 (4-CH), 66.9 (3-CH), 63.9 (5-CH₂), 56.5 (α -RbT), 56.4 (α -Ile), 48.1 (α -Ala), 40.5 (α -Gly), 36.2 (β -Ile), 23.7 (γ -CH₂-Ile), 18.7 (β -Ala), 14.8 (γ -RbT), 14.6 (γ -Ile), 11.0 (δ -CH₃-Ile).

HR-MS (ESI): für C₂₀H₃₆N₄O₁₀H⁺ [M+H]⁺, ber.: 493.2504, gef.: 493.2520.

HPLC: $t_R = 5.11$ min, 5-30 % B in 10 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C18, 3 μ m, 150 x 3 mm, Reinheit: 87 %.

Boronsäureveresterung des Tetrapeptids Ile-RbT-Ala-Gly (P8)

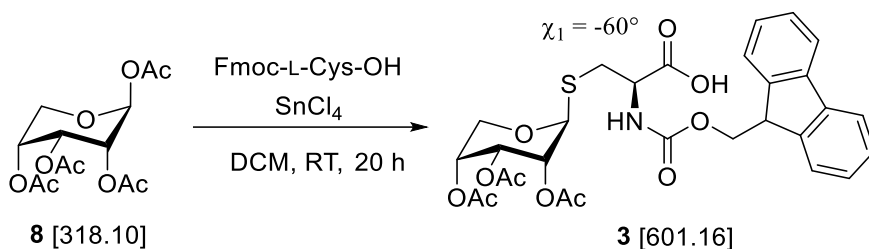


Das Tetrapeptid Ile-RbT-Ala-Gly (**P8**, 1.62 mg, 2.67 μ mol, 1.00 eq) und Pyrenboronsäure (0.66 mg, 2.67 μ mol, 1.00 eq) wurden in 0.60 mL DMSO_{d6} gelöst und nach 20 min NMR-spektroskopisch vermessen. Die Messung wurde nach 12 h wiederholt, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 12.60 (bs, 1H, COOH), 9.01 (d, $^3J_{10H/9H} = 9.3$ Hz, 1H, 10-CH), 8.46 (d, $^3J_{NH-RbT/\alpha-H} = 8.8$ Hz, 1H, NH-RbT), 8.45 (d, $^3J_{2H/3H} = 7.7$ Hz, 1H, 2-CH), 8.36-8.35 (m, 1H, NH-Ala), 8.31 (d, $^3J_{6H,8H/7H} = 7.6$ Hz, 2H, 6-CH, 8-CH), 8.28 (d, $^3J_{3H/2H} = 7.8$ Hz, 1H, 3-CH), 8.24 (d, $^3J_{4H,5H/5H,4H} = 9.3$ Hz, 2H, 4,5-CH), 8.21-8.17 (m, 1H, NH-Gly), 8.16-8.11 (m, 1H, 9-CH), 8.09 (t, $^3J_{7H/6H,8H} = 7.7$ Hz, 1H, 7-CH), 8.08 (bs, 1H, NH₃⁺-Ile), 5.60 (d, $^3J_{cOH/cH} = 2.4$ Hz, 1H, c-OH), 5.14 (d, $^3J_{aH/bH} = 1.8$ Hz, 1H, a-CH), 4.64 (dd, $^3J_{\alpha-RbT/\beta-proR-H} = 3.2$ Hz, $^3J_{\alpha-RbT/\beta-proS-H} = 9.2$ Hz, 1H, α -RbT), 4.45 (quin., $^3J_{\alpha-Ala/\beta-H,NH} = 7.2$ Hz, 1H, α -Ala), 4.30-4.28 (m, 1H, β -RbT), 4.28 (bs, 1H, d-CH), 4.18-4.15 (m, 2H, b/c-CH), 3.93-3.89 (m, 1H, e-CH₂), 3.85-3.82 (m, 1H, α -Ile), 3.81 (t, $^3J_{\alpha-Gly/NH} = 5.4$ Hz, 2H, α -Gly), 3.78-3.74 (m, 1H, e-CH₂), 1.92-1.83 (m, 1H, β -Ile), 1.57-1.48, 1.18-1.09 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.26 (d,

$^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala), 1.20 (d, $^3J_{\gamma\text{-RbT}/\beta\text{-H}} = 6.3$ Hz, 3H, γ -RbT), 0.97 (d, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-H}} = 6.9$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile), 0.88 (t, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-H}} = 7.3$ Hz, 3H, δ -Ile).

***N*-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*O*-((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4,5-triacetoxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-L-cystein-OH (Fmoc-RbC-OH, **3**)**



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [g] | V [ml] |
|--------------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|-------|--------|
| D-Ribose-OAc (8) | 318.10 | - | 1.00 | 0.16 | 50.0 | - |
| Fmoc-L-Cystein-OH | 343.40 | - | 1.20 | 0.19 | 64.7 | - |
| SnCl₄ | 260.53 | 2.23 | 2.00 | 0.32 | 82.0 | 0.04 |

Unter Schutzgas wurden 50.0 mg (**8**, 0.16 mmol, 1.00 eq) D-Ribose-OAc in 2.00 mL DCM (abs.) gelöst und bei 0 °C mit 36.8 μ L (0.32 mmol, 2.00 eq) SnCl₄ für 15 min voraktiviert. Dann wurden 64.7 mg (0.19 mmol, 1.20 eq) Fmoc-L-Cystein-OH hinzugegeben und unter DC-Kontrolle 20 h bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM verdünnt und mit halb-gesättigter NaHCO₃-Lösung und Wasser (2x) gewaschen. Die org. Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (10-90 % MeCN in H₂O, 30 min) lieferten 24.0 mg (0.04 mmol, 36 %) eines weißen Feststoffs **3**.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 12.92 (s, 1H, COOH), 7.89 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.74 (d, $^3J_{\text{NH}/\alpha\text{-H}} = 8.8$ Hz, 1H, NH), 7.72 (d, $^3J = 7.7$ Hz,

Experimenteller Teil

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 7.42 (t, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.35-7.31 (m, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 5.29 (t, $^3J_{3\text{-CH}/2\text{H}} = 3.2$ Hz, 1H, 3-CH), 5.13 (d, $^3J_{1\text{-CH}/2\text{H}} = 6.0$ Hz, 1H, 1-CH), 5.03 (dt, $^3J_{4\text{-CH}/3\text{H}} = 3.5$ Hz, $^4J_{4\text{-CH}/2\text{H}} = 0.6$ Hz, 1H, 4-CH), 4.95 (dd, $^3J_{2\text{-CH}/3\text{H}} = 3.2$ Hz, $^3J_{2\text{-CH}/1\text{H}} = 6.0$ Hz, 1H, 2-CH), 4.33-4.28 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.25-4.22 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.20-4.15 (m, 1H, α -CH), 4.02 (dd, $^3J_{5\text{-proR-H}/4\text{H}} = 3.6$ Hz, $^2J = 12.0$ Hz, 1H, 5-proR-CH₂), 3.68 (dd, $^3J_{5\text{-proS-H}/4\text{H}} = 6.7$ Hz, $^2J = 12.0$ Hz, 1H, 5-proS-CH₂), 3.07 (dd, $^3J_{\beta\text{-proS-H}/4\text{H}} = 4.6$ Hz, $^2J = 13.6$ Hz, 1H, β -proS-CH₂), 2.85 (dd, $^3J_{\beta\text{-proR-H}/4\text{H}} = 9.5$ Hz, $^2J = 13.6$ Hz, 1H, β -proR-CH₂), 2.03, 2.02, 1.99 (3x s, 9H, 3x OAc).

^{13}C NMR: 150 MHz, 300 K, $\text{DMSO-}d_6$ δ [ppm] = 172.0 (COOH), 169.5, 169.5, 169.2 (C=O), 155.9 (Fmoc-C=O), 143.8, 143.7, 140.7 (C_q), 127.6, 127.1, 125.3, 125.2, 120.1 (Fmoc-CH_{aromat.}), 80.6 (1-CH), 67.9 (2-CH), 66.5 (3-CH), 66.2 (4-CH), 65.7 (Fmoc-CH₂), 62.4 (5-CH₂), 53.9 (α -CH), 46.6 (Fmoc-CH), 30.8 (β -CH₂), 20.6, 20.5, 20.4 (OAc).

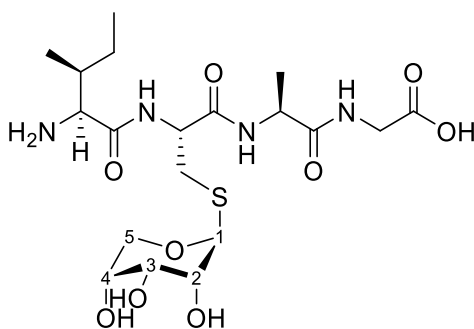
HR-MS (ESI): für $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{NO}_{11}\text{SNa}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 624.1510, gef.: 624.1533.

DC: $R_f = 0.13$ (DCM/MeOH 10:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 3331, 2950, 1744, 1524, 1443, 1371, 1219, 1164, 1107, 1067, 889, 742, 696, 597, 542, 431 \text{ cm}^{-1}$.

HPLC: $t_R = 15.20$ min, 10-90 % B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C18, 3 μm , 150 x 3 mm, Reinheit: 99 %.

Synthese des Tetrapeptids Ile-RbC-Ala-Gly (P3)



Das Peptid **P3** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptidsynthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc- und OAc-Schutzgruppen erfolgte die Abspaltung vom Harz mit wässriger TFA (95 %ig).

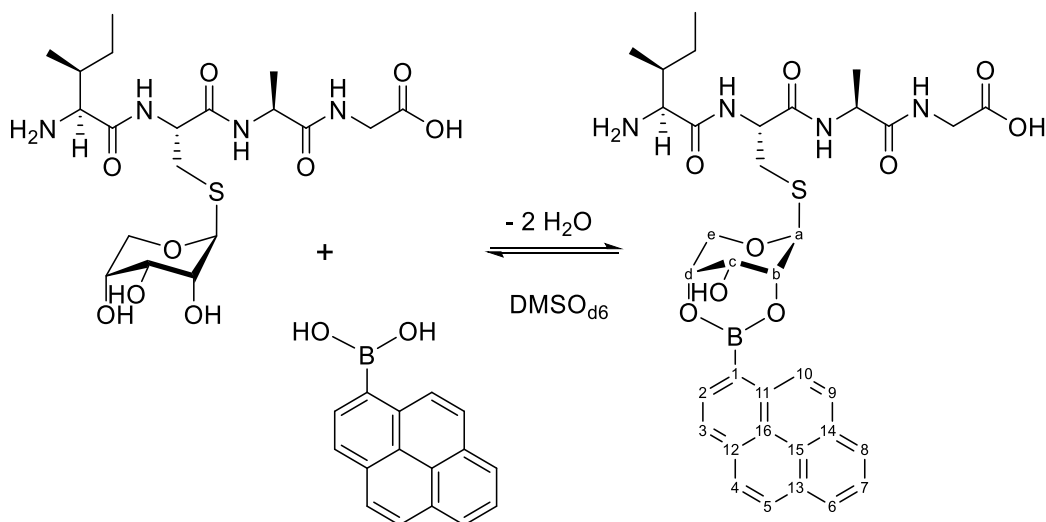
¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 12.57 (s, 1H, COOH), 8.61 (d, $^3J_{\text{NH-RbC}/\alpha\text{-H}} = 7.8$ Hz, 1H, NH-RbC), 8.25 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.5$ Hz, 1H, NH-Ala), 8.16 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.9$ Hz, 1H, NH-Gly), 8.05 (bs, 3H, NH₃⁺-Ile), 5.00 (d, $^3J_{2\text{OH}/2\text{H}} = 7.4$ Hz, 1H, 2-OH), 4.95 (d, $^3J_{3\text{OH}/3\text{H}} = 5.9$ Hz, 1H, 3-OH), 4.89 (d, $^3J_{4\text{OH}/4\text{H}} = 4.3$ Hz, 1H, 4-OH), 4.86 (d, $^3J_{1\text{H}/2\text{H}} = 6.3$ Hz, 1H, 1-CH), 4.53 (dt, $^3J_{\alpha\text{-RbC}/\beta\text{-proR-H}} = 5.7$ Hz, $^3J_{\alpha\text{-RbC}/\beta\text{-proS-H}} = 8.4$ Hz, 1H, α -RbC), 4.31 (quin., $^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H}} = 7.2$ Hz, 1H, α -Ala), 3.80, 3.73 (2x dd, $^3J_{\text{CH}_2\text{-Gly}/\text{NH}} = 6.0$ Hz, $^2J = 17.7$ Hz, 2H, α -Gly), 3.70 (dd, $^3J_{5\text{-proR-H}/4\text{H}} = 3.4$ Hz, $^4J = 11.0$ Hz, 1H, 5-*proR*-CH₂), 3.70-3.67 (m, 1H, 4-CH), 3.67-3.65 (m, 1H, α -Ile), 3.60-3.56 (m, 1H, 3-CH), 3.51 (dd, $^3J_{5\text{-proS-H}/4\text{H}} = 7.2$ Hz, $^4J = 11.0$ Hz, 1H, 5-*proS*-CH₂), 3.41-3.38 (m, 1H, 2-CH), 2.96 (dd, $^3J_{\beta\text{-proS-H}/\alpha\text{-H}} = 5.7$ Hz, $^2J = 13.6$ Hz, 1H, β -*proS*-RbC), 2.73 (dd, $^3J_{\beta\text{-proR-H}/\alpha\text{-H}} = 8.7$ Hz, $^2J = 13.6$ Hz, 1H, β -*proR*-RbC), 1.83-1.78 (m, 1H, β -Ile), 1.49-1.44, 1.15-1.09 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.21 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala), 0.90 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 7.0$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.84 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.4$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 172.1 (COOH), 171.0, 169.1, 167.8 (C=O), 83.6 (1-CH), 71.1 (2-CH), 68.6 (3-CH), 67.9 (4-CH), 65.2 (5-CH₂), 56.5 (α -Ile), 52.9 (α -RbC), 48.1 (α -Ala), 40.5 (α -Gly), 36.3 (β -Ile), 31.2 (β -RbC), 23.7 (γ -CH₂-Ile), 18.3 (β -Ala), 14.5 (γ -CH₃-Ile), 11.1 (δ -Ile).

HR-MS (ESI): für $C_{19}H_{34}N_4O_9SH^+ [M+H]^+$, ber.: 495.2119, gef.: 495.2121.

HPLC: $t_R = 4.82$ min, 5-30 % B in 10 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C18, 3 μ m, 150 x 3 mm, Reinheit: > 99 %.

Boronsäureveresterung des Tetrapeptids Ile-RbC-Ala-Gly (P9)

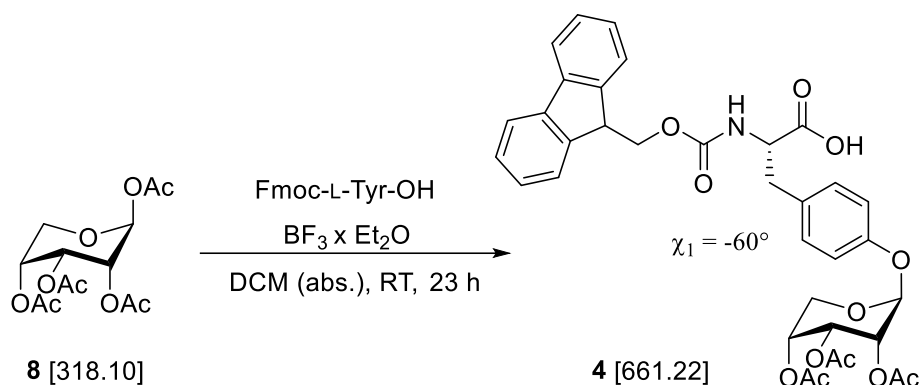


Das Tetrapeptid Ile-RbC-Ala-Gly (**P9**, 2.15 mg, 3.53 μ mol, 1.00 eq) und Pyrenboronsäure (0.87 mg, 3.53 μ mol, 1.00 eq) wurden in 0.60 mL DMSO-d6 gelöst und nach 20 min NMR-spektroskopisch vermessen. Die Messung wurde nach 12 h wiederholt, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten.

1H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d6 δ [ppm] = 12.55 (bs, 1H, COOH), 9.02 (d, $^3J_{10H/9H} = 9.2$ Hz, 1H, 10-CH), 8.67 (d, $^3J_{NH-RbC/\alpha-H} = 8.1$ Hz, 1H, NH-RbC), 8.47 (d, $^3J_{2H/3H} = 7.7$ Hz, 1H, 2-CH), 8.37 (d, $^3J_{NH-Ala/\alpha-H} = 7.6$ Hz, 1H, NH-Ala), 8.32 (d, $^3J_{6H,8H/7H} = 7.6$ Hz, 2H, 6-CH, 8-CH), 8.28 (d, $^3J_{3H/2H} = 7.8$ Hz, 1H, 3-CH), 8.22 (d, $^3J_{4H,5H/5H,4H} = 9.4$ Hz, 2H, 4,5-CH), 8.22 (t, $^3J_{NH-Gly/\alpha-H} = 5.8$ Hz, 1H, NH-Gly), 8.19 (d, $^3J_{9H/10H} = 9.2$ Hz, 1H, 9-CH), 8.09 (t, $^3J_{7H/6H,8H} = 7.6$ Hz, 1H, 7-CH), 8.08 (bs, 1H, NH_3^+ -Ile), 5.81 (d, $^3J_{cOH/cH} = 3.3$ Hz, 1H, c-OH), 5.66 (d, $^3J_{aH/bH} = 1.8$ Hz, 1H, a-CH), 4.57 (ddd, $^3J_{\alpha-RbC/\beta-proR-H} = 5.0$ Hz, $^3J_{\alpha-RbC/\beta-proS-H} = 9.5$ Hz, 1H, α -RbC), 4.34 (quin., $^3J_{\alpha-Ala/\beta-H,NH} = 7.2$ Hz, 1H, α -Ala), 4.34-4.33 (m, 2H, b,d-CH), 4.19 (d, $^2J = 12.4$ Hz, 1H, e-proS-CH₂), 4.00-

3.99 (m, 1H, c-CH), 3.93 (d, $^3J_{e-proR-CH2/dH} = 2.3$ Hz, $^2J = 12.4$ Hz, 1H, e-*proR*-CH₂), 3.81, 3.72 (2x dd, $^3J_{\alpha-Gly/NH} = 5.9$ Hz, $^2J = 17.6$ Hz, 2H, α -Gly), 3.71-3.69 (m, 1H, α -Ile), 3.09 (dd, $^3J_{\beta-proS-H/\alpha-H} = 5.0$ Hz, $^2J = 14.0$ Hz, 1H, β -*proS*-RbC), 2.77 (dd, $^3J_{\beta-proR-H/\alpha-H} = 9.6$ Hz, $^2J = 14.0$ Hz, 1H, β -*proR*-RbC), 1.86-1.81 (m, 1H, β -Ile), 1.51-1.46, 1.17-1.11 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.21 (d, $^3J_{\beta-Ala/\alpha-H} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala), 0.92 (d, $^3J_{\gamma-Ile/\beta-H} = 6.9$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile), 0.86 (t, $^3J_{\delta-Ile/\gamma-H} = 7.3$ Hz, 3H, δ -Ile).

***N*-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*O*-((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4,5-triacetoxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-L-tyrosin-OH (Fmoc-RbY-OH, 4)**



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [g] | V [ml] |
|---|-----------|-----------------------------|------|----------|-------|--------|
| D-Ribose-OAc (8) | 318.10 | - | 1.00 | 0.16 | 50.0 | - |
| Fmoc-L-Tyrosin-OH | 403.43 | - | 1.20 | 0.19 | 80.0 | - |
| BF₃ x Et₂O | 141.93 | 1.15 | 3.00 | 0.47 | 68.7 | 0.06 |

In einem ausgeheizten Schutzgaskolben wurden 50.0 mg (**8**, 0.16 mmol, 1.00 eq) D-Ribose-OAc in 2.00 mL DCM (abs.) gelöst und bei 0 °C mit 68.7 μ L (0.47 mmol, 3.00 eq) BF₃ x Et₂O versetzt. Nach 15 min Rühren wurden 80.0 mg (0.19 mmol, 1.20 eq) Fmoc-L-Tyrosin-OH zugefügt, das Eisbad entfernt und unter DC-Kontrolle 23 h bei RT gerührt. Es wurde mit DCM

Experimenteller Teil

verdünnt und mit 1 M HCl und Wasser (2x) gewaschen. Die org. Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 10:1) ergaben 65.0 mg (0.10 mmol, 53 %) eines weißen Feststoffs **4**.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 12.72 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, 3J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.71 (d, $^3J_{NH/\alpha-H}$ = 8.5 Hz, 1H, NH), 7.64 (t, 3J = 8.3 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.42-7.39 (m, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.33-7.27 (m, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.22 (d, $^3J_{2,6-CH_{aromat.}/3,5H}$ = 8.6 Hz, 2H, 2,6-CH_{aromat.}), 7.00 (d, $^3J_{3,5-CH_{aromat.}/2,6H}$ = 8.6 Hz, 2H, 3,5-CH_{aromat.}), 5.53 (d, $^3J_{1-CH/2H}$ = 4.3 Hz, 1H, 1-CH), 5.45 (t, $^3J_{3-CH/2,4H}$ = 3.5 Hz, 1H, 3-CH), 5.13-5.10 (m, $^3J_{4-CH/5-proR-H,3H}$ = 3.5 Hz, 1H, 4-CH), 5.09 (t, $^3J_{2-CH/3H}$ = 3.5 Hz, $^4J_{2-CH/4H}$ = 0.6 Hz, 1H, 2-CH), 4.21-4.14 (m, 3H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 4.13-4.10 (m, 1H, α -CH), 3.98 (dd, $^3J_{5-proR-H/4H}$ = 3.2 Hz, 2J = 12.4 Hz, 1H, 5-*proR*-CH₂), 3.69 (dd, $^3J_{5-proS-H/4H}$ = 5.4 Hz, 2J = 12.4 Hz, 1H, 5-*proS*-CH₂), 3.03 (dd, $^3J_{\beta-proS-H/\alpha-H}$ = 4.3 Hz, 2J = 13.9 Hz, 1H, β -*proS*-CH₂), 2.82 (dd, $^3J_{\beta-proR-H/\alpha-H}$ = 10.7 Hz, 2J = 13.9 Hz, 1H, β -*proR*-CH₂), 2.06, 2.05, 2.02 (3x s, 9H, 3x OAc).

¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 173.4, 172.1, 169.6 (C=O), 156.0 (Fmoc-C=O), 154.4 (C_q), 143.8, 143.8, 140.7 (Fmoc-C_q), 132.3 (C_q), 130.4 (2,6-CH_{aromat.}), 127.7, 127.1, 125.3, 120.2 (Fmoc-CH_{aromat.}), 116.5 (3,5-CH_{aromat.}), 96.0 (1-CH), 67.6 (2-CH), 66.1 (4-CH), 65.9 (3-CH), 65.6 (Fmoc-CH₂), 61.3 (5-CH₂), 55.8 (α -CH), 46.6 (Fmoc-CH), 35.7 (β -CH₂), 20.7, 20.6, 20.5 (OAc).

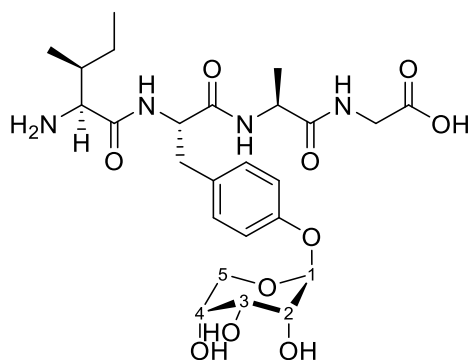
HR-MS (ESI): für C₃₅H₃₅NO₁₂Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 684.2051, gef.: 684.2076.

DC: R_f = 0.18 (DCM/MeOH 10:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2955, 1741, 1511, 1445, 1371, 1221, 1129, 1073, 1046, 931, 884, 831, 740, 599, 540, 496, 422 cm⁻¹.

HPLC: t_R = 15.81 min, 10-90 % B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C18, 3 μ m, 150 x 3 mm, Reinheit: 97 %.

Synthese des Tetrapeptids Ile-RbY-Ala-Gly (P4)



Das Peptid **P4** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptidsynthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc- und OAc-Schutzgruppen erfolgte die Abspaltung vom Harz mit wässriger TFA (95 %ig).

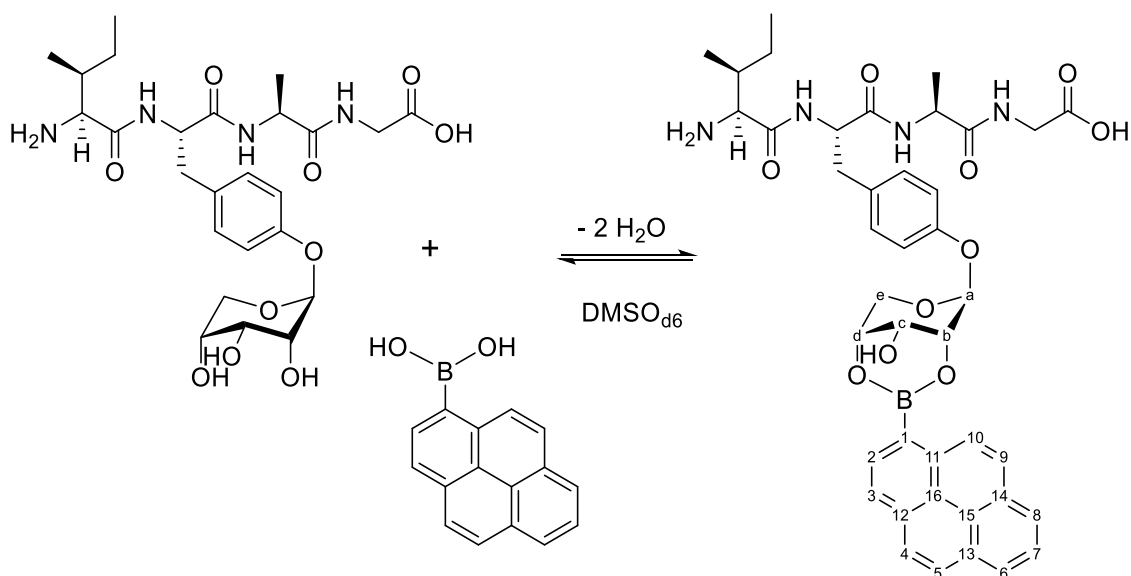
¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 12.61 (s, 1H, COOH), 8.46 (d, $^3J_{\text{NH-RbY}/\alpha\text{-H}} = 8.0$ Hz, 1H, NH-RbY), 8.26 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.6$ Hz, 1H, NH-Ala), 8.09 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.9$ Hz, 1H, NH-Gly), 7.21 (d, $^3J_{2,6\text{-CH}_{\text{aromat.}}/3,5\text{H}} = 8.6$ Hz, 2H, 2,6-CH_{aromat.}), 6.91 (d, $^3J_{3,5\text{-CH}_{\text{aromat.}}/2,6\text{H}} = 8.6$ Hz, 2H, 3,5-CH_{aromat.}), 5.22 (d, $^3J_{1\text{H}/2\text{H}} = 5.3$ Hz, 1H, 1-CH), 5.08 (bs, 1H, 2-OH), 4.94, 4.93 (2x s, 2H, 3-OH, 4-OH), 4.59 (dt, $^3J_{\alpha\text{-RbY}/\beta\text{-proR-H}} = 4.5$ Hz, $^3J_{\alpha\text{-RbY}/\beta\text{-proS-H}} = 8.6$ Hz, 1H, α -RbY), 4.33 (quin., $^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H}} = 7.3$ Hz, 1H, α -Ala), 3.86-3.85 (m, 1H, 3-CH), 3.79, 3.72 (2x dd, $^3J_{\text{CH}_2\text{-Gly}/\text{NH}} = 5.9$ Hz, $^2J = 17.6$ Hz, 2H, α -Gly), 3.69-3.65 (m, 1H, 4-CH), 3.61 - 3.58 (m, 2H, 5-CH₂-RbY), 3.59-3.58 (m, 1H, α -Ile), 3.55-3.53 (m, 1H, 2-CH), 3.00 (dd, $^3J_{\beta\text{-proS-RbY}/\alpha\text{-H}} = 4.3$ Hz, $^2J = 14.2$ Hz, 1H, β -proS-RbY), 2.76 (dd, $^3J_{\beta\text{-proR-RbY}/\alpha\text{-H}} = 9.5$ Hz, $^2J = 14.3$ Hz, 1H, β -proR-RbY), 1.85-1.80 (m, 1H, β -Ile), 1.44-1.39, 1.11-1.05 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.22 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala), 0.90 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 6.9$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.83 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.3$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 172.2, 171.0, 170.2 (C=O), 155.4 (4-C_q-Tyr), 130.9 (1-C_q-Tyr), 130.2 (2,6-Tyr), 116.1 (3,5-Tyr), 98.6 (1-CH), 70.3 (2-CH), 68.2 (3-CH), 67.8 (4-CH), 63.9 (5-CH₂), 56.6 (α -Ile), 54.1 (α -RbY), 48.0 (α -Ala), 40.6 (α -Gly), 36.4 (β -Ile), 23.4 (γ -CH₂-Ile), 18.3 (β -Ala), 14.7 (γ -Ile), 11.1 (δ -CH₃-Ile).

HR-MS (ESI): für $C_{25}H_{38}N_4O_{10}H^+$ $[M+H]^+$, ber.: 555.2661, gef.: 555.2681.

HPLC: $t_R = 4.20$ min, 10-25 % B in 10 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C18, 3 μ m, 150 x 3 mm, Reinheit: > 99 %.

Boronsäureveresterung des Tetrapeptids Ile-RbY-Ala-Gly (P10)

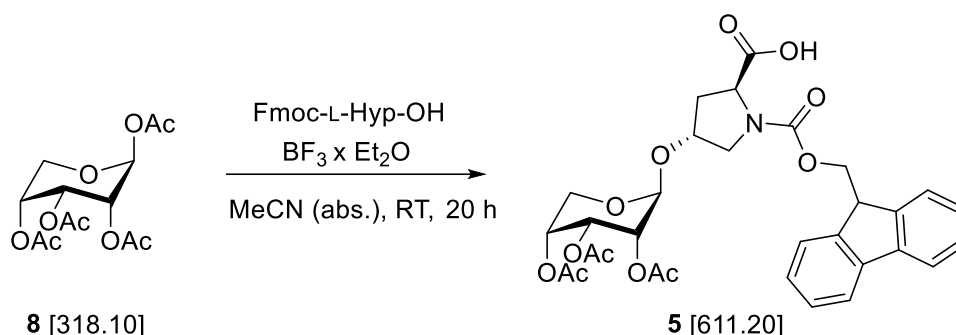


Das Tetrapeptid Ile-RbY-Ala-Gly (**P10**, 1.61 mg, 2.41 μ mol, 1.00 eq) und Pyrenboronsäure (0.59 mg, 2.41 μ mol, 1.00 eq) wurden in 0.60 mL $DMSO_{d6}$ gelöst und nach 20 min NMR-spektroskopisch vermessen. Die Messung wurde nach 12 h wiederholt, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten.

1H NMR: 300 MHz, 300 K, $DMSO_{d6}$ δ [ppm] = 9.04 (d, $^3J_{10H/9H} = 9.2$ Hz, 1H, 10-CH), 8.51-8.48 (m, 1H, NH-RbY), 8.49 (d, $^3J_{2H/3H} = 7.8$ Hz, 1H, 2-CH), 8.32 (d, $^3J_{6H,8H/7H} = 7.6$ Hz, 2H, 6-CH, 8-CH), 8.31-8.28 (m, 1H, NH-Ala), 8.28 (d, $^3J_{3H/2H} = 7.8$ Hz, 1H, 3-CH), 8.24 (d, $^3J_{4H,5H/5H,4H} = 9.4$ Hz, 2H, 4,5-CH), 8.22 (d, $^3J_{9H/10H} = 9.3$ Hz, 1H, 9-CH), 8.18 (t, $^3J_{NH-Gly/\alpha-H} = 5.7$ Hz, 1H, NH-Gly), 8.09 (t, $^3J_{7H/6H,8H} = 7.6$ Hz, 1H, 7-CH), 8.09 (bs, 1H, NH_3^+ -Ile), 7.27 (d, $^3J_{2,6-CH_{aromat.}/3,5H} = 8.6$ Hz, 2H, 2,6- $CH_{aromat.}$), 7.09 (d, $^3J_{3,5-CH_{aromat.}/2,6H} = 8.6$ Hz, 2H, 3,5- $CH_{aromat.}$), 5.86 (d, $^3J_{cOH/cH} = 2.2$ Hz, 1H, c-OH), 5.82 (d, $^3J_{aH/bH} = 2.4$ Hz, 1H, a-CH), 4.65-4.58 (m, 1H, α -RbY), 4.46-4.41 (m, 2H, b,d-CH), 4.33 (quin.,

$^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H,NH}} = 7.3$ Hz, 1H, α -Ala), 4.02-3.92 (m, 2H, e-CH₂), 3.98 - 3.97 (m, 1H, c-CH), 3.76 (t, $^3J_{\alpha\text{-Gly}/\text{NH}} = 5.7$ Hz, 2H, α -Gly), 3.60-3.58 (m, 1H, α -Ile), 3.05 (dd, $^3J_{\beta\text{-proS-RbY}/\alpha\text{-H}} = 4.3$ Hz, $^2J = 14.2$ Hz, 1H, β -proS-RbY), 2.78 (dd, $^3J_{\beta\text{-proR-RbY}/\alpha\text{-H}} = 9.6$ Hz, $^2J = 14.2$ Hz, 1H, β -proR-RbY), 1.87-1.79 (m, 1H, β -Ile), 1.47-1.37, 1.14-1.04 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.22 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala), 0.90 (d, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-H}} = 6.9$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile), 0.83 (t, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-H}} = 7.3$ Hz, 3H, δ -Ile).

(2*S*,4*R*)-1-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-4-(((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4,5-triacetoxy-tetra-hydro-2*H*-pyran-2-yl)-L-*trans*-hydroxyprolin-OH (Fmoc-RHp-OH, 5)



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [g] | V [ml] |
|-------------------------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|-------|--------|
| D-Ribose-OAc (8) | 318.10 | - | 1.00 | 0.16 | 50.0 | - |
| Fmoc-L-Hydroxyprolin-OH | 353.38 | - | 1.20 | 0.19 | 66.6 | - |
| BF ₃ x Et ₂ O | 141.93 | 1.15 | 3.00 | 0.47 | 68.7 | 0.06 |

50.0 mg (**8**, 0.16 mmol, 1.00 eq) D-Ribose-OAc wurden unter Schutzgasatmosphäre in 2.00 mL MeCN (abs.) gelöst. Es wurden 66.6 mg (0.19 mmol, 1.20 eq) Fmoc-L-Hydroxyprolin-OH, sowie 60.0 μ L (0.47 mmol, 3.00 eq) BF₃ x Et₂O hinzugefügt und 20 h bei RT gerührt. Der Reaktionsumsatz wurde mittels DC verfolgt. Acetonitril wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit DCM aufgenommen und mit 1 M HCl und Wasser (2x) gewaschen.

Experimenteller Teil

Die org. Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt. Semipräparative HPLC (10-90 % MeCN in H₂O, 30 min) lieferten 34.5 mg (0.06 mmol, 36 %) eines weißen Feststoffs **5**.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 12.96, 12.70 (2x s, 1H, *cis/trans*-COOH), 7.89 (t, ³J = 7.8 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.66-7.63 (m, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.44-7.40 (m, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.36-7.31 (m, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 5.27 (q, ³J_{3-CH/2,4H} = 3.6 Hz, ⁴J_{3-CH/5-proR-H} = 0.6 Hz, 1H, 3-*cis/trans*-CH), 5.05-5.01 (m, ³J_{4-CH/5-proR-H,3H} = 3.6 Hz, ³J_{4-CH/5-proS-H} = 5.7 Hz, ⁴J_{4-CH/2H} = 0.6 Hz, 1H, 4-*cis/trans*-CH), 4.98 (2x d, ³J_{1-CH/2H} = 4.4 Hz, 1H, 1-*cis/trans*-CH), 4.86-4.82 (m, ³J_{2-CH/3H} = 3.6 Hz, ³J_{2-CH/1H} = 4.4 Hz, ⁴J_{2-CH/4H} = 0.6 Hz, 1H, 2-*cis/trans*-CH), 4.43-4.40 (m, 1H, γ-*cis/trans*-CH), 4.38-4.16 (m, 3H, Fmoc-CH, Fmoc-CH₂), 4.34, 4.13 (2x d, ³J_{α-CH/β-H} = 8.0 Hz, 1H, α-*cis/trans*-CH), 3.90 (2x dd, ³J_{5-proR-H/4H} = 3.4 Hz, ²J = 12.2 Hz, ⁴J_{5-proR-H/3H} = 0.6 Hz, 1H, 5-*proR-cis/trans*-CH₂), 3.69 (2x dd, ³J_{5-proS-H/4H} = 5.7 Hz, ²J = 12.2 Hz, 1H, 5-*proS-cis/trans*-CH₂), 3.59-3.53 (m, 1H, δ-*cis/trans*-CH₂), 2.48-2.44, 2.15-2.10 (2x m, 1H, β-*proS-cis/trans*-CH₂), 2.38-2.33, 2.01-1.99 (2x m, 1H, β-*proR-cis/trans*-CH₂), 2.05, 2.04, 2.01 (3x s, 9H, 3x OAc).

¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 173.7, 173.2 (*cis/trans*-COOH), 169.7, 169.5, 169.5, 169.5 (*cis/trans*-C=O), 154.0, 153.8 (Fmoc-*cis/trans*-C=O), 143.8, 143.8, 140.8, 140.7 (*cis/trans*-C_q), 127.8, 127.2, 125.3, 125.2, 125.1, 120.2 (Fmoc-*cis/trans*-CH_{aromat.}), 96.8, 96.7 (1-*cis/trans*-CH), 75.9, 74.8 (γ-*cis/trans*-CH), 67.9 (2-CH), 67.2 (Fmoc-CH₂), 66.3 (4-CH), 66.0 (3-CH), 60.9 (5-CH₂), 57.5, 57.1 (α-*cis/trans*-CH), 52.9, 52.4 (δ-*cis/trans*-CH₂), 46.6 (Fmoc-CH), 35.9 (β-*proS-cis/trans*-CH₂), 34.9 (β-*proR-cis/trans*-CH₂), 20.7, 20.6, 20.5 (OAc).

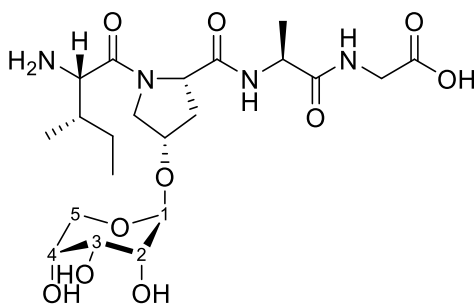
HR-MS (ESI): für C₃₁H₃₃NO₁₂Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 634.1895, gef.: 634.1921.

DC: R_f = 0.40 (DCM/MeOH 5:1).

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 2950, 1712, 1426, 1361, 1220, 1166, 1129, 1066, 976, 828, 738, 598, 544, 422 cm⁻¹.

HPLC: t_R = 14.48 min, 10-90 % B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C18, 3 μm, 150 x 3 mm, Reinheit: 99 %.

Synthese des Tetrapeptids Ile-RHp-Ala-Gly (P5)



Das Peptid **P5** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptidsynthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc- und OAc-Schutzgruppen erfolgte die Abspaltung vom Harz mit wässriger TFA (95 %ig).

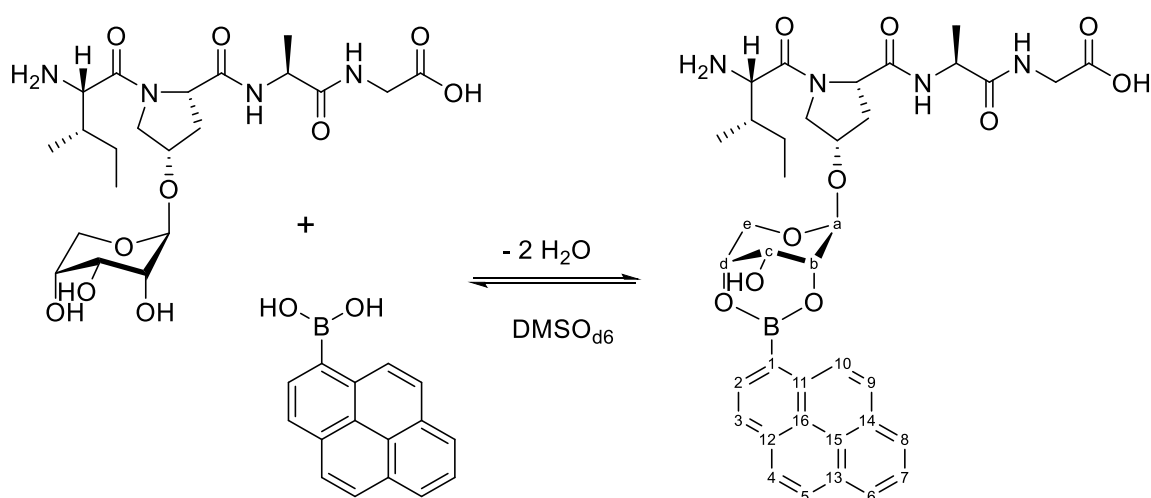
¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 12.56 (s, 1H, COOH), 8.17 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.6$ Hz, 1H, NH-Ala), 8.13 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.8$ Hz, 1H, NH-Gly), 8.01 (bs, 1H, NH₃⁺-Ile), 4.95 (bs, 1H, 4-OH), 4.85 (bs, 1H, 3-OH), 4.79 (bs, 1H, 2-OH), 4.68 (d, $^3J_{\text{IH}/2\text{H}} = 4.8$ Hz, 1H, 1-CH), 4.48 (t, $^3J_{\alpha\text{-RHp}/\beta\text{-H}} = 8.3$ Hz, 1H, α -RHp), 4.41-4.40 (m, 1H, γ -RHp), 4.29 (quin., $^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H}} = 7.3$ Hz, 1H, α -Ala), 4.07-4.05 (m, 1H, α -Ile), 3.85-3.83, 3.63-3.60 (m, 2H, δ -RHp), 3.79, 3.71 (2x dd, $^3J_{\text{CH}_2\text{-Gly}/\text{NH}} = 5.9$ Hz, $^2J = 17.4$ Hz, 2H, α -Gly), 3.69 (dd, $^3J_{5\text{-proR-RHp}/4\text{H}} = 4.1$ Hz, $^2J = 11.5$ Hz, 5-proR-CH₂-RHp), 3.61-3.58 (m, 1H, 3-CH), 3.57-3.56 (m, 1H, 4-CH), 3.56 (dd, $^3J_{5\text{-proS-RHp}/4\text{H}} = 4.7$ Hz, $^2J = 11.5$ Hz, 5-proS-CH₂-RHp), 3.29-3.28 (m, 1H, 2-CH), 2.30 (dd, $^3J_{\beta\text{-RHp}/\alpha,\gamma\text{-H}} = 7.7$ Hz, $^2J = 13.4$ Hz, 1H, β -RHp), 1.89 (dd, $^3J_{\beta\text{-RHp}/\alpha,\gamma\text{-H}} = 4.3$ Hz, $^2J = 13.4$ Hz, 1H, β -RHp), 1.85-1.80 (m, 1H, β -Ile), 1.51-1.46, 1.15-1.09 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.22 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.1$ Hz, 3H, β -Ala), 0.99 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 6.9$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.85 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.2$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 172.4 (COOH), 171.2, 170.3, 167.1 (C=O), 157.9 (C_q), 99.1 (1-CH), 75.2 (γ -CH), 70.7 (2-CH), 68.3 (3-CH), 67.6 (5-CH₂), 63.8 (4-CH), 58.5 (α -CH), 55.4 (α -Ile), 53.9 (δ -CH₂), 48.1 (α -Ala), 40.6 (α -Gly), 35.8 (β -Ile), 34.3 (β -CH₂), 23.1 (γ -CH₂-Ile), 18.3 (β -Ala), 14.5 (γ -Ile), 11.4 (δ -CH₃-Ile).

HR-MS (ESI): für $C_{21}H_{36}N_4O_{10}H^+$ $[M+H]^+$, ber.: 505.2504, gef.: 505.2509.

HPLC: $t_R = 5.25$ min, 5-30 % B in 10 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C18, 3 μ m, 150 x 3 mm, Reinheit: 96 %.

Boronsäureveresterung des Tetrapeptids Ile-RHp-Ala-Gly (P11)

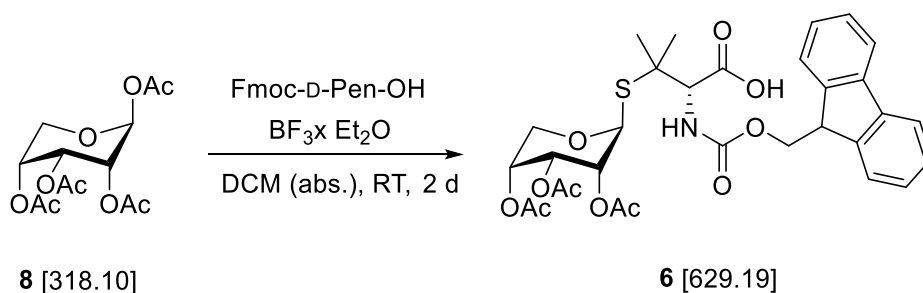


Das Tetrapeptid Ile-RHp-Ala-Gly (**P11**, 2.12 mg, 3.50 μ mol, 1.00 eq) und Pyrenboronsäure (0.87 mg, 3.50 μ mol, 1.00 eq) wurden in 0.60 mL $DMSO_{d6}$ gelöst und nach 20 min NMR-spektroskopisch vermessen. Die Messung wurde nach 12 h wiederholt, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten.

1H NMR: 500 MHz, 300 K, $DMSO_{d6}$ δ [ppm] = 12.54 (bs, 1H, COOH), 9.02 (d, $^3J_{10H/9H} = 9.2$ Hz, 1H, 10-CH), 8.47 (d, $^3J_{2H/3H} = 7.8$ Hz, 1H, 2-CH), 8.32 (d, $^3J_{6H,8H/7H} = 7.7$ Hz, 2H, 6-CH, 8-CH), 8.28 (d, $^3J_{3H/2H} = 7.8$ Hz, 1H, 3-CH), 8.24 (d, $^3J_{9H/10H} = 9.2$ Hz, 1H, 9-CH), 8.21 (d, $^3J_{4H,5H/5H,4H} = 9.4$ Hz, 2H, 4,5-CH), 8.20-8.19 (m, 1H, NH-Ala), 8.17 (t, $^3J_{NH-Gly/\alpha-H} = 5.9$ Hz, 1H, NH-Gly), 8.09 (t, $^3J_{7H/6H,8H} = 7.6$ Hz, 1H, 7-CH), 8.07-8.05 (m, 1H, NH_3^+ -Ile), 5.70 (bs, 1H, c-OH), 5.25 (d, $^3J_{aH/bH} = 2.2$ Hz, 1H, a-CH), 4.57 (dd, $^3J_{\alpha-RHp/\beta-H} = 7.6$ Hz, 1H, α -RHp), 4.55-4.54 (m, 1H, d-CH), 4.36-4.35 (m, 1H, b-CH), 4.33 (quin., $^3J_{\alpha-Ala/\beta-H,NH} = 7.3$ Hz, 1H, α -Ala), 4.18-4.17 (m, 1H, c-CH), 4.16-4.14 (m, 1H,

γ -RHp), 4.15-4.13 (m, 1H, α -Ile), 3.99-3.97 (m, 1H, *e-proS*-CH₂-RHp), 3.93-3.92 (m, 2H, δ -RHp), 3.80, 3.73 (2x dd, $^3J_{\alpha\text{-Gly}/\text{NH}} = 5.9$ Hz, $^2J = 17.6$ Hz, 2H, α -Gly), 3.69 (dd, $^3J_{e\text{-CH}_2/\text{dH}} = 3.8$ Hz, $^2J = 11.2$ Hz, 1H, *e-proR*-CH₂-RHp), 2.48-2.44, 1.95-1.90 (2x m, 2H, β -RHp), 1.89-1.85 (m, 1H, β -Ile), 1.54-1.50, 1.17-1.13 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.24 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala), 1.02 (d, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile), 0.88 (t, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-H}} = 7.2$ Hz, 3H, δ -Ile).

***N*-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*O*-((2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4,5-triacetoxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-*D*-penicillamin-OH (Fmoc-Rpa-OH, 6)**



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [g] | V [ml] |
|---|-----------|-----------------------------|------|----------|-------|--------|
| D-Ribose-OAc (8) | 318.10 | - | 1.00 | 0.16 | 50.0 | - |
| Fmoc-D-Penicillamin-OH | 371.43 | - | 1.20 | 0.19 | 70.6 | - |
| BF₃ x Et₂O | 141.93 | 1.15 | 3.00 | 0.47 | 66.8 | 0.06 |

50.0 mg (**8**, 0.16 mmol, 1.00 eq) D-Ribose-OAc wurden unter Schutzgas in 2.00 mL DCM (abs.) gelöst und bei 0 °C mit 60.0 μ L (0.47 mmol, 3.00 eq) BF₃ x Et₂O für 15 min voraktiviert. 70.6 mg (0.19 mmol, 1.20 eq) Fmoc-D-Penicillamin-OH wurden hinzugegeben und unter DC-Kontrolle wurde 2 d bei RT geführt. Nach Verdünnen mit DCM wurde mit 1 M HCl und Wasser (2x) gewaschen, die org. Phase über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter

vermindertem Druck entfernt. Die Aufreinigung erfolgte über semipräparative HPLC (40-80 % MeCN in H₂O, 60 min) und lieferte 65.0 mg (0.10 mmol, 53 %) eines weißen Feststoffs **6**.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 12.89 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, 3J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.74 (d, 3J = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.56 (d, $^3J_{NH/\alpha-H}$ = 9.3 Hz, 1H, NH), 7.41 (t, 3J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.34-7.31 (m, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 5.29 (d, $^3J_{I-CH/2H}$ = 4.3 Hz, 1H, 1-CH), 5.15 (t, $^3J_{3-CH/2,4H}$ = 3.0 Hz, 1H, 3-CH), 5.00-4.98 (m, 1H, 4-CH), 4.94 (t, $^3J_{2-CH/1H}$ = 4.2 Hz, 1H, 2-CH), 4.34 (dd, 3J = 7.3 Hz, 2J = 10.2 Hz, 1H, Fmoc-CH₂), 4.30-4.27 (m, 1H, Fmoc-CH₂), 4.25-4.22 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.20 (d, $^3J_{\alpha-H/NH}$ = 9.3 Hz, 1H, α -CH), 4.03 (d, 2J = 12.2 Hz, 1H, 5-*proR*-CH₂), 3.59 (dd, $^3J_{5-proS-H/4H}$ = 5.4 Hz, 2J = 12.3 Hz, 1H, 5-*proS*-CH₂), 2.04, 2.03, 2.01 (3x s, 9H, 3x OAc), 1.41 (s, 3H, γ -CH₃), 1.41 (s, 3H, γ -CH₃).

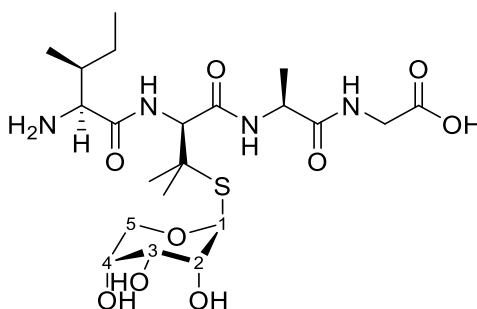
¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 171.2 (COOH), 169.6, 169.5, 169.4 (C=O), 156.1 (Fmoc-C=O), 143.8, 140.7 (C_q), 127.7, 127.1, 125.4, 125.3, 120.2, 120.1 (Fmoc-CH_{aromat.}), 79.5 (1-CH), 68.6 (2-CH), 66.3 (3-CH), 66.3 (4-CH), 65.9 (Fmoc-CH₂), 62.1 (α -CH), 62.1 (5-CH₂), 46.7 (Fmoc-CH), 26.7, 25.9 (γ -CH₃), 20.7, 20.6, 20.5 (OAc).

HR-MS (ESI): für C₃₁H₃₅NO₁₁SN⁺ [M+Na]⁺, ber.: 652.1823, gef.: 652.1823.

IR (ATR): $\tilde{\nu}$ = 3326, 2973, 1740, 1524, 1447, 1371, 1222, 1065, 972, 890, 741, 597, 543, 424 cm⁻¹.

HPLC: t_R = 10.99 min, 40-80 % B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C18, 3 μ m, 150 x 3 mm, Reinheit: 99 %.

Synthese des Tetrapeptids Ile-Rpa-Ala-Gly (P6)



Das Peptid **P6** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptidsynthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc- und OAc-Schutzgruppen erfolgte die Abspaltung vom Harz mit wässriger TFA (95%ig).

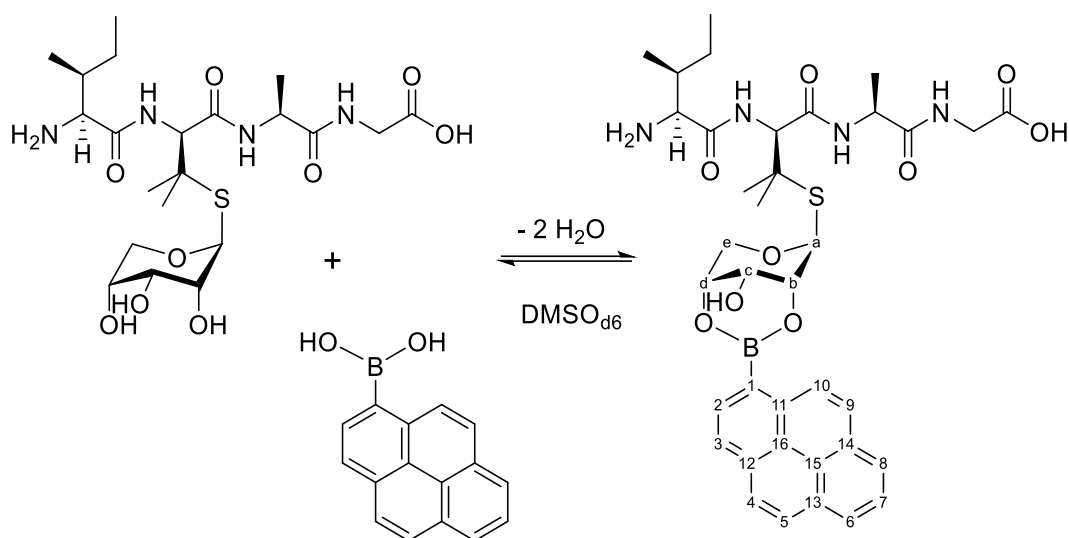
¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 12.58 (s, 1H, COOH), 8.61 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.9$ Hz, 1H, NH-Ala), 8.53 (d, $^3J_{\text{NH-Rpa}/\alpha\text{-H}} = 8.9$ Hz, 1H, NH-Rpa), 8.23 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.9$ Hz, 1H, NH-Gly), 8.00 (bs, 3H, NH₃⁺-Ile), 5.08 (d, $^3J_{1\text{H}/2\text{H}} = 5.7$ Hz, 1H, 1-CH), 5.03 (d, $^3J_{2\text{OH}/2\text{H}} = 7.7$ Hz, 1H, 2-OH), 4.95 (d, $^3J_{3\text{OH}/3\text{H}} = 6.0$ Hz, 1H, 3-OH), 4.92 (d, $^3J_{4\text{OH}/4\text{H}} = 5.0$ Hz, 1H, 4-OH), 4.68 (d, $^3J_{\alpha\text{-Rpa}/\text{NH}} = 8.9$ Hz, 1H, α -Rpa), 4.40 (quin., $^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H}} = 7.3$ Hz, 1H, α -Ala), 3.91-3.89 (m, 1H, α -Ile), 3.75 (d, $^3J_{\text{CH}_2\text{-Gly}/\text{NH}} = 6.0$ Hz, 2H, α -Gly), 3.70 (dd, $^3J_{5\text{-proR-H}/4\text{H}} = 2.8$ Hz, $^4J = 11.2$ Hz, 1H, 5-*proR*-CH₂), 3.62-3.60 (m, 1H, 4-CH), 3.57-3.54 (m, 1H, 3-CH), 3.50 (dd, $^3J_{5\text{-proS-H}/4\text{H}} = 6.3$ Hz, $^4J = 11.2$ Hz, 1H, 5-*proS*-CH₂), 3.40-3.36 (m, 1H, 2-CH), 1.87-1.82 (m, 1H, β -Ile), 1.54-1.49, 1.15-1.09 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.36, 1.34 (2x s, 6H, 2x γ -Rpa), 1.23 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.1$ Hz, 3H, β -Ala), 0.98 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 7.0$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.85 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.4$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 172.3 (COOH), 171.1, 168.0, 167.7 (C=O), 155.9 (C_q), 81.9 (1-CH), 71.8 (2-CH), 68.2 (3-CH), 67.9 (4-CH), 64.9 (5-CH₂), 59.1 (α -Rpa), 56.7 (α -Ile), 47.8 (α -Ala), 40.6 (α -Gly), 36.7 (β -Ile), 26.8, 25.1 (γ -Rpa), 23.1 (γ -CH₂-Ile), 18.5 (β -Ala), 14.8 (γ -CH₃-Ile), 11.4 (δ -Ile).

HR-MS (ESI): für C₂₁H₃₈N₄O₉SH⁺ [M+H]⁺, ber.: 523.2432, gef.: 523.2436.

HPLC: $t_R = 3.28$ min, 10-70 % B in 8 min, 0.45 mL/min, ACE UltraCore 2.5, SuperC18, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

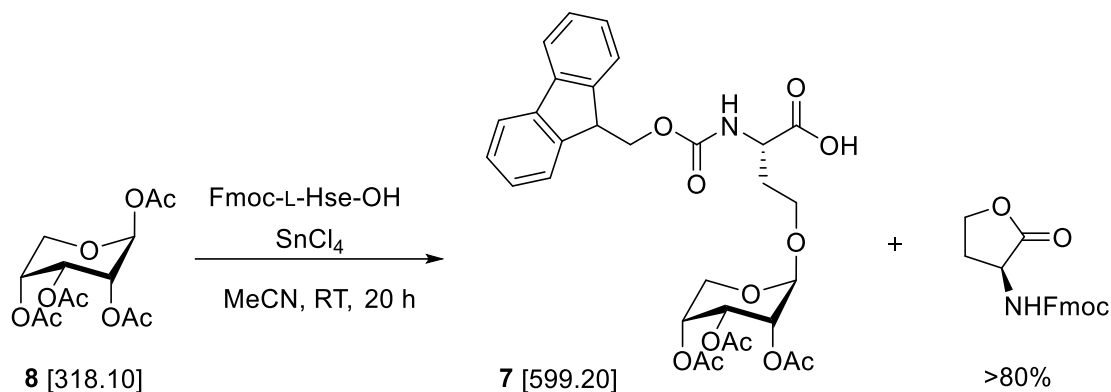
Boronsäureveresterung des Tetrapeptids Ile-Rpa-Ala-Gly (P12)



Das Tetrapeptid Ile-Rpa-Ala-Gly (**P12**, 2.05 mg, 3.22 μmol , 1.00 eq) und Pyrenboronsäure (0.79 mg, 3.22 μmol , 1.00 eq) wurden in 0.60 mL DMSO_{d6} gelöst und nach 20 min NMR-spektroskopisch vermessen. Die Messung wurde nach 12 h wiederholt, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 12.59 (s, 1H, COOH), 9.04 (d, $^3J_{10\text{H}/9\text{H}} = 9.3$ Hz, 1H, 10-CH), 8.82 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 8.0$ Hz, 1H, NH-Ala), 8.65 (d, $^3J_{\text{NH-Rpa}/\alpha\text{-H}} = 9.2$ Hz, 1H, NH-Rpa), 8.49 (d, $^3J_{2\text{H}/3\text{H}} = 7.8$ Hz, 1H, 2-CH), 8.32 (d, $^3J_{6\text{H},8\text{H}/7\text{H}} = 7.6$ Hz, 2H, 6-CH, 8-CH), 8.28 (m, $^3J_{3\text{H}/2\text{H}} = 7.9$ Hz, 1H, 3-CH), 8.25 (d, $^3J_{4\text{H},5\text{H}/5\text{H},4\text{H}} = 9.3$ Hz, 2H, 4,5-CH), 8.24-8.21 (m, 1H, NH-Gly), 8.19 (d, $^3J_{9\text{H}/10\text{H}} = 9.3$ Hz, 1H, 9-CH), 8.09 (t, $^3J_{7\text{H}/6\text{H},8\text{H}} = 7.7$ Hz, 1H, 7-CH), 8.04 (bs, 1H, NH₃⁺-Ile), 5.80 (d, $^3J_{\text{cOH}/\text{cH}} = 3.0$ Hz, 1H, c-OH), 5.77 (d, $^3J_{\text{aH}/\text{bH}} = 1.9$ Hz, 1H, a-CH), 4.88 (d, $^3J_{\alpha\text{-Rpa}/\text{NH}} = 9.2$ Hz, 1H, α -Rpa), 4.46 (quin., $^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H},\text{NH}} = 7.3$ Hz, 1H, α -Ala), 4.31 (bs, 2H, b,d-CH), 4.13 (d, $^2J = 12.4$ Hz, 1H, e-*proS*-CH₂), 3.97-3.94 (m, 1H, c-CH), 3.95-3.93 (m, 1H, α -Ile), 3.86 (d, $^3J_{\text{e-proR-CH}_2/\text{dH}} = 2.4$ Hz, $^2J = 12.4$ Hz, 1H, e-*proR*-CH₂), 3.75 (d, $^3J_{\alpha\text{-Gly}/\text{NH}} = 5.8$ Hz, 2H, α -Gly), 1.91-1.83 (m, 1H, β -Ile), 1.62-1.52, 1.18-1.11 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.44 (2x s, 6H, 2x γ -Rpa), 1.26 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala), 1.01 (d, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-H}} = 6.9$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile), 0.90 (t, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-H}} = 7.1$ Hz, 3H, δ -Ile).

***N*-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*O*-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4,5-triacetoxytetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-L-homoserin-OH (Fmoc-RHs-OH, 7)**



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [g] | V [ml] |
|---------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|-------|--------|
| D-Ribose-OAc (8) | 318.10 | - | 1.00 | 0.25 | 80.0 | - |
| Fmoc-L-Homoserin-OH | 341.13 | - | 1.20 | 0.30 | 102 | - |
| SnCl ₄ | 260.53 | 2.23 | 3.00 | 0.75 | 196 | 0.09 |

In einem ausgeheizten Kolben wurden 80.0 mg (8, 0.25 mmol, 1.00 eq) D-Ribose-OAc in 2.00 mL MeCN (abs.) gelöst und mit 88.1 μ L (0.75 mmol, 3.00 eq) SnCl₄ für 15 min bei 0 °C gerührt. Anschließend wurden 102 mg (0.30 mmol, 1.20 eq) Fmoc-L-Homoserin-OH hinzugegeben und unter DC-Kontrolle 20 h bei RT geführt. Das Acetonitril wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand mit DCM aufgenommen und mit 1 M HCl und Wasser (2x) gewaschen. Die org. Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Mittels semipräparativer HPLC (30-90 % MeCN in H₂O, 30 min) erfolgte die Aufreinigung und es konnten 14.0 mg (0.02 mmol, 10 %) eines weißen Feststoffs 7 erhalten werden. Als Hauptprodukt wurde das Lacton des Homoserins gewonnen.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 12.75 (s, 1H, COOH), 7.89 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.71 (dd, ³J = 6.1 Hz, ⁴J = 1.0 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.67 (d, ³J_{NH/ α -H} = 8.2 Hz, 1H, NH), 7.42 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.34-7.31 (m, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 5.23 (d, ³J_{3-CH/4H} = 3.5 Hz, 1H, 3-CH), 5.00 (q, ³J_{4-CH/3H} = 3.5 Hz, 1H, 4-CH), 4.86 (t, ³J_{2-CH/1H} = 3.8 Hz, 1H, 2-CH), 4.81 (t,

Experimenteller Teil

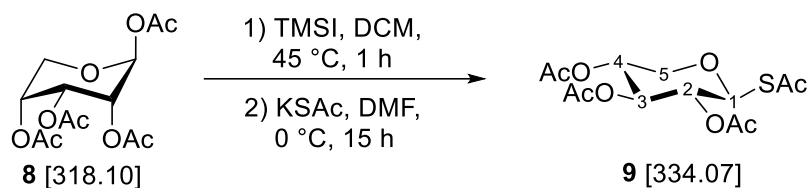
$^3J_{1-CH/2H} = 3.8$ Hz, 1H, 1-CH), 4.34-4.27 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.24-4.21 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.08-4.04 (m, 1H, α -CH), 3.85 (dd, $^3J_{5-proR-H/4H} = 2.8$ Hz, $^2J = 12.4$ Hz, 1H, 5-*proR*-CH₂), 3.71-3.66 (m, 1H, γ -CH₂), 3.61 (dd, $^3J_{5-proS-H/4H} = 4.7$ Hz, $^2J = 12.4$ Hz, 1H, 5-*proS*-CH₂), 3.52-3.48 (m, 1H, γ -CH₂), 2.07-2.03 (m, 1H, β -CH₂), 2.05, 2.04, 1.97 (3x s, 9H, 3x OAc), 1.86-1.79 (m, 1H, β -CH₂).

¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 173.3 (COOH), 169.2, 169.1, 168.9 (C=O), 155.7 (Fmoc-C=O), 143.3, 140.2 (C_q), 127.1, 126.6, 124.7, 119.6 (Fmoc-CH_{aromat.}), 96.8 (1-CH), 67.1 (2-CH), 65.8 (4-CH), 65.2 (3-CH), 65.1 (Fmoc-CH₂), 63.4 (5-CH₂), 60.0 (γ -CH₂), 50.1 (α -CH), 46.1 (Fmoc-CH), 29.8 (β -CH₂), 20.2, 20.1, 20.0 (OAc).

HR-MS (ESI): für C₃₀H₃₃NO₁₂Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 622.1905, gef.: 622.1895.

IR (ATR): $\tilde{\nu} = 2944, 1720, 1522, 1443, 1371, 1220, 1162, 1137, 1068, 976, 895, 738, 653, 598, 541, 490, 424$ cm⁻¹.

HPLC: t_R = 6.97 min, 25-90 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

(2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-2-(Acetylthio)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl-triacetat (9)

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [mg] | V [ml] |
|---------------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|--------|--------|
| D-Ribose-OAc (8) | 318.10 | - | 1.00 | 0.63 | 200 | - |
| Trimethylsilyliodid | 200.09 | 1.41 | 1.20 | 0.75 | 151 | 0.11 |
| Kaliumthioacetat | 114.21 | - | 1.20 | 0.75 | 86.1 | - |

200 mg (**8**, 0.63 mmol, 1.00 eq) D-Ribose-OAc wurden unter Schutzgasatmosphäre in 2.00 mL DCM (abs.) gelöst und mit 107 μ L (0.75 mmol, 1.20 eq) TMSI versetzt. Es wurde 1 h bei 45 °C refluxiert, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde. Der Rückstand wurde in 4.00 mL DMF aufgenommen und unter Eisbadkühlung mit 86.1 mg (0.75 mmol, 1.20 eq) KSAc versetzt. Anschließend wurde 15 h bei RT gerührt, die Reaktionslösung mit EtOAc/Wasser verdünnt und die org. Phase mit ges. NaHCO₃- und NaCl-Lösung gewaschen. Zuletzt wurde über Na₂SO₄ getrocknet, *in vacuo* das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch (DCM/MeOH 10:1) aufgereinigt. Es konnten 87.0 mg (0.26 mmol, 41 %) eines gelblichen Öls **9** erhalten werden.

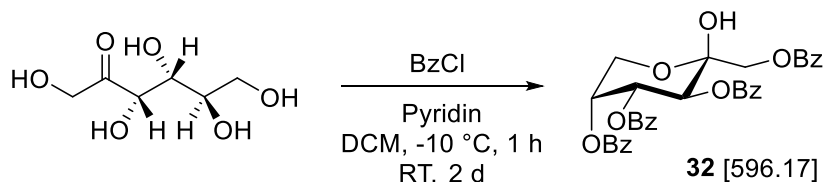
¹H NMR: 500 MHz, 298 K, Aceton-d₆ δ [ppm] = 5.59 (d, $^3J_{1-CH/2H}$ = 7.7 Hz, 1H, 1-CH), 5.49 (dt, $^3J_{3-CH/2H,4H}$ = 3.1 Hz, $^4J_{3-CH/1H,5-proR-CH2}$ = 0.6 Hz, 1H, 3-CH), 5.08 (dd, $^3J_{2-CH/1H}$ = 7.7 Hz, $^3J_{2-CH/3H}$ = 3.1 Hz, $^4J_{2-CH/4H}$ = 0.6 Hz, 1H, 2-CH), 5.04 (dd, $^3J_{4-CH/5-proS-CH2}$ = 7.7 Hz, $^3J_{4-CH/3H,5-proR-CH2}$ = 3.1 Hz, $^4J_{4-CH/2H}$ = 0.6 Hz, 1H, 4-CH), 3.93 (dd, $^3J_{5-proR-CH2/4H}$ = 4.0 Hz, 2J = 12.0 Hz, 1H, 5-*proR*-CH₂), 3.75 (dd, $^3J_{5-proS-CH2/4H}$ = 7.4 Hz, 2J = 12.0 Hz, 1H, 5-*proS*-CH₂), 2.42 (s, 3H, SAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.02 (s, 3H, OAc), 2.01 (s, 3H, OAc).

^{13}C NMR: 125 MHz, 298 K, Aceton $_d$ 6 δ [ppm] = 192.5 (C=S), 170.3, 170.1, 169.8 (C=O), 79.8 (1-CH), 68.8 (4-CH), 68.1 (3-CH), 67.2 (2-CH), 65.1 (5-CH $_2$), 31.0 (SAc), 20.6 (3x OAc).

HR-MS (ESI): für C $_{13}$ H $_{18}$ O $_8$ SNa $^+$ [M+Na] $^+$, ber.: 357.0615, gef.: 357.0622.

DC: R_f = 0.33 (DCM/MeOH 10:1).

(2*S*,3*S*,4*S*,5*S*)-5-((Benzoyloxy)methyl)-5-hydroxytetrahydro-2*H*-pyran-2,3,4-triyl-tri-benzoat (32**)**



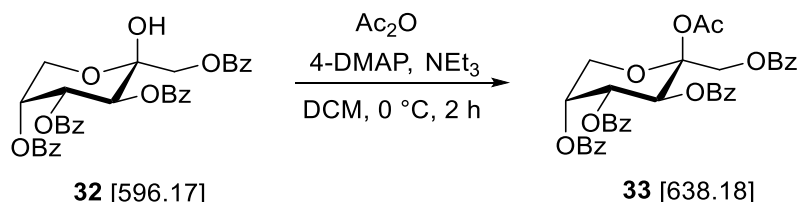
| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm 3] | eq | n [mmol] | m [g] | V [ml] |
|---------------------|-----------|---------------------|------|----------|-------|--------|
| D-Fructose | 180.16 | - | 1.00 | 11.0 | 2.00 | - |
| Benzoylchlorid | 140.57 | 1.22 | 4.00 | 44.0 | 6.19 | 5.07 |

Bei -10 °C wurden 6.00 mL Pyridin mit 9.00 mL DCM und 6.19 mL (44.0 mmol, 4.00 eq) Benzoylchlorid versetzt und portionsweise 2.00 g (11.0 mmol, 1.00 eq) D-Fructose zugegeben. Nach 1 h Rühren wurde auf RT erwärmt, weitere 3.00 mL DCM hinzugefügt und 2 d bei RT gerührt. Anschließend wurde mit 5.00 mL DCM verdünnt, 8.00 mL Eiswasser zugegeben und die org. Phase dreimal mit dest. Wasser gewaschen, sowie mit 2 M HCl, ges. NaHCO $_3$ -Lösung (3x) und erneut mit dest. Wasser (2x). Zuletzt wurde die org. Phase über Na $_2$ SO $_4$ getrocknet und unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde mit EtOH aufgenommen und unter Kühlung auskristallisiert. Der abfiltrierte, kristalline Niederschlag ergab 2.20 g (3.70 mmol, 35 %) des Produkts **32**.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 8.07 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 2H, Bz-CH), 7.92 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 2H, Bz-CH), 7.87 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 2H, Bz-CH), 7.72 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 2H, Bz-CH), 7.64 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 2H, Bz-CH), 7.61 - 7.50 (m, 4H, Bz-CH), 7.48-7.43 (m, 4H, Bz-CH), 7.33 (dt, ³J = 7.6 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 2H, Bz-CH), 6.10 (d, ³J_{4H,3H} = 10.5 Hz, 1H, 3-CH), 5.82 (dd, ³J_{4H,3H} = 10.5 Hz, ³J_{4H,5H} = 3.4 Hz, 1H, 4-CH), 5.74-5.73 (m, 1H, 5-CH), 4.51 (d, ²J = 11.6 Hz, 1H, 1-CH₂), 4.40 (dd, ³J_{6-proR-CH2,5H} = 1.4 Hz, ²J = 13.3 Hz, 1H, 6-proR-CH₂), 4.21 (d, ²J = 11.6 Hz, 1H, 1-CH₂), 3.99 (dd, ³J_{6-proS-CH2,5H} = 1.9 Hz, ²J = 13.3 Hz, 1H, 6-proS-CH₂).

HR-MS (ESI): für C₃₄H₂₈O₁₀Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 619.1575, gef.: 619.1589.

(2*S*,3*S*,4*S*,5*S*)-5-Acetoxy-5-((benzoyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2,3,4-triyl-tri-benzoat (33)



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [g] | V [ml] |
|---------------------------|-----------|------------------------|------|----------|-------|--------|
| Tetrabenzoylfructose (32) | 596.17 | - | 1.00 | 1.68 | 1.00 | - |
| Triethylamin | 101.19 | 0.73 | 4.00 | 6.70 | 0.78 | 1.07 |
| 4-DMAP | 122.17 | - | 0.05 | 0.08 | 0.01 | - |
| Essigsäureanhydrid | 102.09 | 1.08 | 3.00 | 5.00 | 0.52 | 0.48 |

Experimenteller Teil

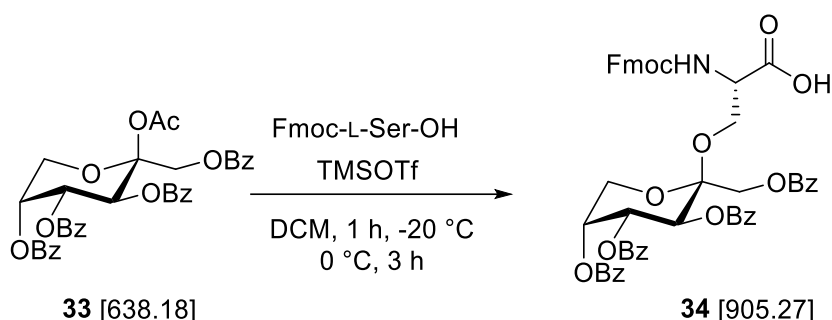
1.00 g (**32**, 1.68 mmol, 1.00 eq) der Tetrabenzoyl-geschützten D-Fructose wurden in 12.0 mL DCM gelöst und im Eisbad gekühlt. Nach Zugabe von 1.07 mL (6.70 mmol, 4.00 eq) Triethylamin, 0.01 g (0.08 mmol, 0.05 eq) 4-DMAP und 0.48 mL (5.00 mmol, 3.00 eq) Essigsäureanhydrid wurde 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von MeOH beendet und die Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Durch säulenchromatographische Aufreinigung (Pentan/EtOAc 3:1 → 4:1) konnten 971 mg (1.52 mmol, 91 %) eines weißen Schaums **33** gewonnen werden.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 8.01 (dd, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 2H, Bz-CH), 7.91 (dd, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 2H, Bz-CH), 7.88 (dd, $^3J = 8.4$ Hz, $^4J = 1.3$ Hz, 2H, Bz-CH), 7.75-7.51 (m, 8H, Bz-CH), 7.44 (t, $^3J = 7.7$ Hz, 4H, Bz-CH), 7.35 (dt, $^3J = 7.7$ Hz, $^4J = 1.5$ Hz, 2H, Bz-CH), 6.22 (d, $^3J_{4H,3H} = 10.3$ Hz, 1H, 3-CH), 5.85 (dd, $^3J_{4H,3H} = 10.4$ Hz, $^3J_{4H,5H} = 3.3$ Hz, 1H, 4-CH), 5.82-5.80 (m, 1H, 5-CH), 5.35 (d, $^2J = 11.8$ Hz, 1H, 1-CH₂), 4.63 (d, $^2J = 11.8$ Hz, 1H, 1-CH₂), 4.40 (dd, $^3J_{6-proR-CH2,5H} = 1.2$ Hz, $^2J = 13.5$ Hz, 1H, 6-*proR*-CH₂), 4.20 (dd, $^3J_{6-proS-CH2,5H} = 1.8$ Hz, $^2J = 13.5$ Hz, 1H, 6-*proS*-CH₂), 2.33 (s, 3H, OAc).

HR-MS (ESI): für C₃₆H₃₀O₁₁Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 661.1680, gef.: 661.1690.

DC: R_f = 0.39 (Pentan/EE 3:1).

N-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*O*-((2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4,5-tris(benzoyloxy)-2-((benzoyloxy)methyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)-L-serin (Fmoc-FtS-OH, **34**)



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [mg] | V [ml] |
|---|-----------|------------------------|------|----------|--------|--------|
| Tetrabenzoyl-2-acetylfructose (33) | 638.18 | - | 1.00 | 0.16 | 100 | - |
| Fmoc-L-Serin-OH | 327.33 | - | 1.20 | 0.19 | 61.5 | - |
| TMSOTf | 222.25 | 1.23 | 0.20 | 0.03 | 6.98 | 0.06 |

Unter Schutzgasatmosphäre wurden 100 mg (**33**, 0.16 mmol, 1.00 eq) der zweifach geschützten D-Fructose in 2.00 mL DCM (abs.) gelöst und unter Rühren bei -20 °C mit 61.5 mg (0.19 mmol, 1.20 eq) Fmoc-L-Serin-OH versetzt. Nach Zugabe von 5.70 µL (0.03 mmol, 0.20 eq) TMSOTf wurde 1 h bei -20 °C und anschließend weitere 3 h bei 0 °C unter DC-Kontrolle gerührt. Es wurde mit Triethylamin neutralisiert, die Suspension filtriert und das Filtrat unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 20:1 → 10:1) lieferten 71.0 mg (0.08 mmol, 50 %) eines gelblichen Schaums **34**.

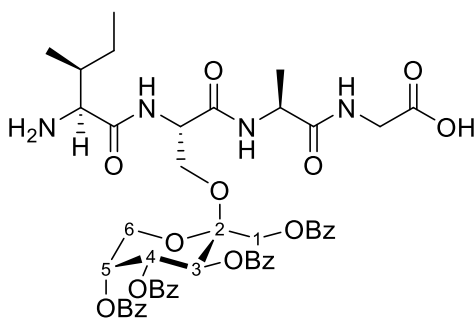
¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 13.17 (bs, 1H, COOH), 8.00 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 2H, Bz-CH), 7.90-7.89 (m, 4H, Bz-CH), 7.89-7.88 (m, 2H, Fmoc-CH), 7.75 (dd, ³J = 7.5 Hz, ²J = 11.1 Hz, 2H, Fmoc-CH), 7.71-7.67 (m, 2H, Bz-CH), 7.64 (dd, ³J = 8.4 Hz, ⁴J = 1.3 Hz, 2H, Bz-CH), 7.54-7.43 (m, 6H, Bz-CH), 7.41-7.30 (m, 2H, Fmoc-CH), 7.37-7.31 (m, 4H, Bz-CH), 7.32-7.29 (m, 2H, Fmoc-CH), 6.15 (d, ³J_{4H,3H} = 9.9 Hz, 1H, 3-CH), 5.71 (bs, 1H, 5-CH), 5.71 - 5.68 (m, 1H, 4-CH), 4.77 (d, ²J = 11.9 Hz, 1H, 1-CH₂), 4.42 (d,

$^2J = 11.9$ Hz, 1H, 1-CH₂), 4.36-4.34 (m, 1H, α -CH), 4.35-4.33 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.30-4.28 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.28-4.26 (m, 1H, 6-*proR*-CH₂), 4.05-4.02 (m, 1H, β -CH₂), 4.03-4.01 (m, 1H, 6-*proS*-CH₂), 3.99-3.96 (m, 1H, β -CH₂).

HR-MS (ESI): für C₅₂H₄₃NO₁₄Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 928.2576, gef.: 928.2592.

DC: R_f = 0.35 (DCM/MeOH 10:1).

Synthese des Tetrapeptids Ile-FtS-Ala-Gly (P64)



Das Peptid **P64** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptid-synthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppe sollten die Benzoyl-Schutzgruppen analog der Acetyl-Schutzgruppe abgespalten werden, jedoch wurde das Peptid nach Abspaltung vom Harz mit wässriger TFA (95 %ig) nur in der vierfach Benzoyl-geschützten Form erhalten.

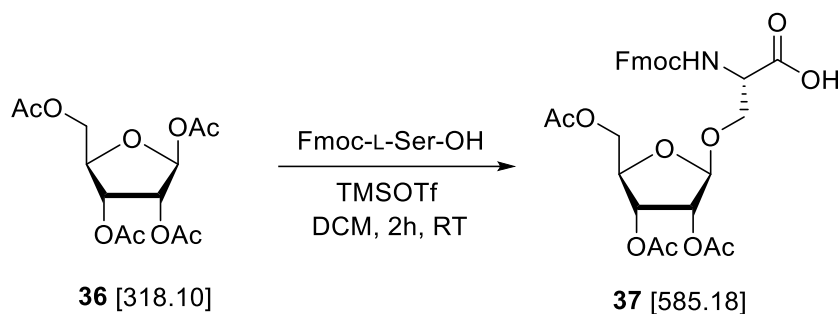
¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 8.74 (d, $^3J_{\text{NH-FtS}/\alpha\text{-H}} = 6.5$ Hz, 1H, NH-FtS), 8.40 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.3$ Hz, 1H, NH-Ala), 8.35 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.8$ Hz, 1H, NH-Gly), 8.06-7.32 (m, 20H, 4x Bz-FtS), 6.18 (d, $^3J_{\text{CH}/4\text{H}} = 10.5$ Hz, 1H, 3-CH), 5.80-5.79 (m, 1H, 5-CH), 4.69 (dd, $^3J_{\text{CH}/3\text{H},5\text{H}} = 3.3$ Hz, 1H, 4-CH), 4.83-4.80 (m, 1H, α -FtS), 4.78 (d, $^2J = 11.7$ Hz, 1H, 1-CH), 4.47 (quin., $^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H}} = 7.2$ Hz, 1H, α -Ala), 4.39 (d, $^2J = 11.7$ Hz, 1H, 1-CH), 4.24 (d, $^2J = 12.9$ Hz, 1H, 6-CH₂), 4.04 (dd, $^2J = 13.3$ Hz, $^4J_{\text{CH}/4\text{H}} = 1.7$ Hz, 1H, 6-CH₂), 4.02 (dd, $^3J_{\beta\text{-FtS}/\alpha\text{-H}} = 4.7$ Hz, $^2J = 9.3$ Hz, 1H, β -FtS), 3.89 (dd, $^3J_{\beta\text{-FtS}/\alpha\text{-H}} = 4.6$ Hz, $^2J = 9.3$ Hz, 1H, β -FtS), 3.83, 3.68 (2x dd, $^3J_{\text{CH}_2\text{-Gly}/\text{NH}} = 6.2, 5.7$ Hz, $^2J = 17.7$ Hz, 2H, α -Gly), 3.77 (bs, 1H, α -Ile), 1.91-1.86 (m, 1H, β -Ile), 1.56-1.49, 1.20-1.14

Experimenteller Teil

(2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.32 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.1$ Hz, 3H, β -Ala), 0.97 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 6.9$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.86 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.3$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

HPLC: $t_R = 6.90$ min, 25-90 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

***N*-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*O*-((2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-3,4-diacetoxy-5-(acetoxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)-L-serin (Fmoc-RfS-OH, **37**)**



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [mg] | V [ml] |
|--------------------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|--------|--------|
| D-Ribofuranose-OAc (36) | 318.10 | - | 1.00 | 0.16 | 50.0 | - |
| Fmoc-L-Serin-OH | 327.33 | - | 1.00 | 0.16 | 52.4 | - |
| TMSOTf | 222.25 | 1.23 | 0.55 | 0.09 | 20.0 | 0.02 |

In einem ausgeheizten Kolben wurden 50 mg (**36**, 0.16 mmol, 1.00 eq) D-Ribofuranose-OAc sowie 52.4 mg (0.16 mmol, 1.00 eq) Fmoc-L-Serin-OH in 2.00 mL DCM (abs.) gelöst und mit Molsieb 4 Å versetzt. Anschließend wurden 16.3 μ L (0.09 mmol, 0.55 eq) TMSOTf zugegeben und im Argonstrom für 2 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit DCM verdünnt, mit Triethylamin neutralisiert und zweimal mit Wasser gewaschen. Zuletzt wurde über Na₂SO₄

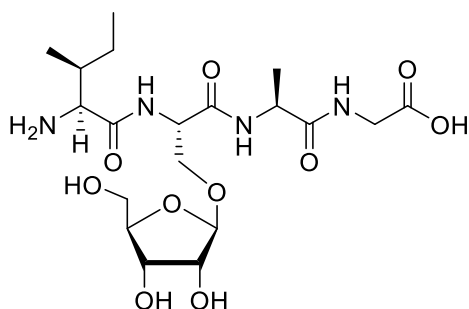
getrocknet und nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 10:1 → 5:1) konnten 37.0 mg (63.2 μ mol, 40 %) eines weißen Feststoffs **37** erhalten werden.

^1H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 12.91 (s, 1H, COOH), 7.89 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.72 (d, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.41 (t, $^3J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.32 (dt, $^4J = 1.1$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 5.14-5.13 (m, 1H, 3-CH), 5.12-5.11 (m, 1H, 4-CH), 5.07 (s, 1H, 1-CH), 4.29-4.28 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.27-4.26 (m, 1H, α -CH), 4.26-4.24 (m, 1H, 5-*proS*-CH₂), 4.24-4.22 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.03 (dd, $^3J_{5\text{HproR},4\text{H}} = 6.0$ Hz, $^2J = 11.6$ Hz, 1H, 5-*proR*-CH₂), 3.88 (dd, $^3J_{\beta\text{HproR},\alpha\text{H}} = 5.8$ Hz, $^2J = 9.9$ Hz, 1H, β -*proR*-CH₂), 3.66 (dd, $^3J_{\beta\text{HproR},\alpha\text{H}} = 3.8$ Hz, $^2J = 10.0$ Hz, 1H, β -*proR*-CH₂), 2.07 (s, 3H, 5-OAc), 2.01, 2.00 (2x s, 6H, 2,3-OAc).

HR-MS (ESI): für $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{NO}_{12}\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 608.1738, gef.: 608.1744.

DC: $R_f = 0.46$ (DCM/MeOH 5:1).

Synthese des Tetrapeptids Ile-RfS-Ala-Gly (P65)



Das Peptid **P65** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptid-synthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc- und OAc-Schutzgruppen erfolgte die Abspaltung vom Harz mit wässriger TFA (95 %ig).

¹H NMR: 600 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 12.57 (s, 1H, COOH), 8.51 (d, $^3J_{\text{NH-RfS}/\alpha\text{-H}} = 7.7$ Hz, 1H, NH-RfS), 8.21 (d, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.9$ Hz, 1H, NH-Gly), 8.15 (t, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.6$ Hz, 1H, NH-Ala), 8.05 (bs, 3H, NH₃⁺-Ile), 5.10 (bs, 1H, 5-OH), 4.92 (d, $^3J_{1\text{CH}/2\text{H}} = 4.4$ Hz 1H, 1-CH), 4.75 (s, 1H, 3-OH), 4.63 (s, 1H, 2-OH), 4.43 (q, $^3J = 7.7$ Hz, 1H, α -RfS), 4.33 (quin., $^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H}} = 7.2$ Hz, 1H, α -Ala), 3.89-3.86 (m, 1H, 2-CH), 3.80-3.78 (m, 1H, 3-CH), 3.76-3.73 (m, 2H, α -Gly), 3.72-3.70 (m, 1H, α -Ile), 3.67-3.63 (m, 1H, β -RfS), 3.61-3.58 (m, 1H, β -RfS), 3.60-3.59 (m, 1H, 4-CH), 3.58-3.55 (m, 1H, 5-CH₂), 3.43-3.40 (m, 1H, 5-CH₂), 1.83-1.77 (m, 1H, β -Ile), 1.52-1.48, 1.16-1.10 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.23 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.2$ Hz, 3H, β -Ala), 0.90 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 6.8$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.85 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.4$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

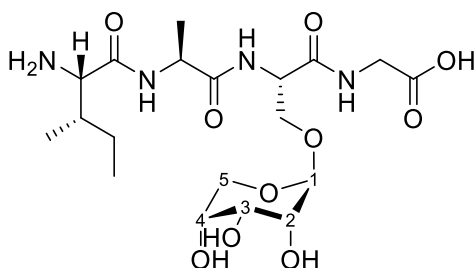
HPLC: $t_R = 2.64$ min, 5-35 % B in 8 min, 0.45 mL/min, ACE UltraCore 2.5, SuperC18, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99%.

HR-MS (ESI): für C₁₉H₃₄N₄O₁₀Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 501.2167, gef.: 501.2170.

6.5 Synthese weiterer Peptide mit glykosylierten Bausteinen

Alle Molmassen der dargestellten Peptide sind als die entsprechenden Reinpeptide ohne Trifluoracetat-Gegenion aufgeführt. Grundsätzlich wurde auf die Angabe von Ausbeuten verzichtet, da stets unbekannte Mengen Salze und Deletionsmutanten enthalten waren. Es wurde stets versucht, alle Peptide in einer tabellarischen Darstellung der ^1H -NMR-Verschiebungen zuzuordnen, was jedoch zum Teil wegen der Vielzahl an Signalen großer Peptide, deren Fehlen oder Überlappen nicht immer vollständig möglich war. Grundsätzlich wurde Massenspektroskopie betrieben und HPLC Elugramme aufgenommen, um die Reinheit der Peptide zu analysieren. Peptide, die Verunreinigungen aufwiesen, wurden mithilfe semi-präparativer HPLC aufgereinigt, sodass anschließend eine Reinheit von $> 95 \%$ gewährleistet werden konnte.

Synthese des Tetrapeptids Ile-Ala-RbS-Gly (P66)



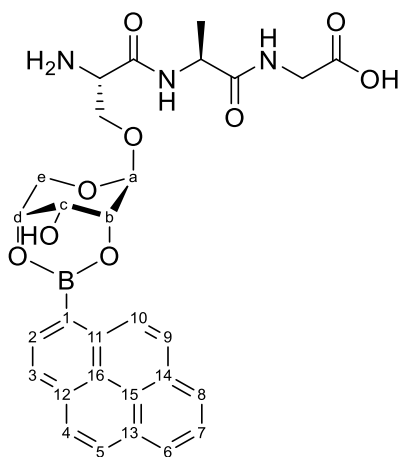
Das Peptid **P66** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptidsynthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc- und OAc-Schutzgruppen, erfolgte die Abspaltung vom Harz mit wässriger TFA (95 %ig).

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 8.52 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.3$ Hz, 1H, NH-Ala), 8.14 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.6$ Hz, 1H, NH-Gly), 8.10 (d, $^3J_{\text{NH-Ser}/\alpha\text{-H}} = 8.3$ Hz, 1H, NH-RbS), 4.91 (bs, 3H, 2,3,4-OH), 4.58 (d, $^3J_{\text{IH}/2\text{H}} = 3.9$ Hz, 1H, 1-CH), 4.53-4.49 (m, 1H, α -RbS), 4.46 (t, $^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H}} = 7.1$ Hz, 1H, α -Ala), 3.82 (dd, $^3J_{\beta\text{proR-RbS}/\alpha\text{-H}} = 5.6$ Hz, $^2J = 10.0$ Hz, 1H, β -proR-RbS), 3.73 (dd, $^3J_{\text{CH}_2\text{-Gly}/\text{NH}} = 5.6$ Hz, 2H, α -Gly), 3.64-3.63 (m, 1H, 3-CH), 3.61-3.59 (m, 1H, α -Ile), 3.51-3.47 (m, 2H, 4-CH, 5-proR-CH₂), 3.51-3.47 (m, 2H, 5-proS-CH₂), 3.50 (dd, $^3J_{\beta\text{proS-RbS}/\alpha\text{-H}} = 4.9$ Hz, $^2J = 10.0$ Hz, 1H, β -proS-RbS), 3.41-3.40 (m, 1H, 2-CH), 1.80-1.75 (m, 1H, β -Ile), 1.51-1.47 (m, 1H, γ -CH₂-Ile), 1.26 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala), 1.15-1.10 (m, 1H, γ -CH₂-Ile), 0.89 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 6.9$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.85 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.3$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 171.7, 171.0, 169.2, 167.9 (C=O), 100.7 (1-CH), 70.6 (2-CH), 68.7 (4-CH), 67.6 (β -RbS), 66.3 (3-CH), 63.8 (5-CH₂), 56.6 (α -Ile), 52.3 (α -RbS), 48.2 (α -Ala), 41.0 (α -Gly), 36.3 (β -Ile), 23.9 (γ -CH₂-Ile), 18.1 (β -Ala), 14.5 (γ -CH₃-Ile), 11.1 (δ -Ile).

HR-MS (ESI): für C₁₉H₃₄N₄O₁₀Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 501.2167, gef.: 501.2164.

Boronsäureveresterung des Tripeptids RbS-Ala-Gly (P67)

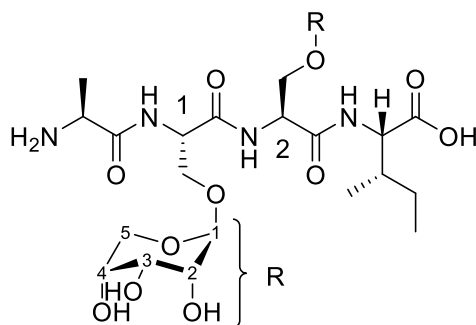


Das Tripeptid RbS-Ala-Gly (**P67**, 5.00 mg, 13.7 μmol , 1.00 eq) und Pyrenboronsäure (3.36 mg, 13.7 μmol , 1.00 eq) wurden in 0.60 mL DMSO-d_6 gelöst und nach 2 h NMR-spektroskopisch vermessen. Die Messung wurde nach 12 h wiederholt, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten.

^1H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 12.78 (bs, 1H, COOH), 9.01 (d, $^3J_{10\text{H}/9\text{H}} = 9.2$ Hz, 1H, 10-CH), 8.56 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 6.3$ Hz, 1H, NH-Ala), 8.46 (d, $^3J_{2\text{H}/3\text{H}} = 7.8$ Hz, 1H, 2-CH), 8.33 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.4$ Hz, 1H, NH-Gly), 8.32-8.30 (m, 2H, 6-CH, 8-CH), 8.26 (d, $^3J_{3\text{H}/2\text{H}} = 7.8$ Hz, 1H, 3-CH), 8.23-8.18 (m, 3H, 4-CH, 5-CH, 9-CH), 8.09 (t, $^3J_{7\text{H}/6\text{H},8\text{H}} = 7.7$ Hz, 1H, 7-CH), 5.09 (s, 1H, a-CH), 4.48-4.42 (m, 1H, α -Ala), 4.31 (s, 1H, d-CH), 4.27 (s, 1H, b-CH), 4.16 (s, 1H, c-CH), 3.96-3.92 (m, 1H, β -proR-RbS), 3.93 (m, 1H, α -RbS), 3.92-3.89, 3.86-3.82 (2x m, 2H, e-CH₂), 3.81-3.77 (m, 2H, α -Gly), 3.80-3.76 (m, 1H, β -proS-RbS), 1.28 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala).

^{13}C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 172.0 (C=O-Ala), 171.0 (COOH), 167.9 (C=O-RbS), 157.8, 157.6 (C_q), 134.9, 132.7, 132.3, 130.7, 130.2, 128.2, 127.8, 127.4, 127.2, 126.1, 125.3, 125.2, 124.0, 123.8, 123.7 (Pyren-CH/C_q), 98.6 (a-CH), 70.5 (b/d-CH), 67.3 (β -RbS), 63.7 (e-CH₂), 60.6 (c-CH), 52.9 (α -RbS), 48.0 (α -Ala), 40.7 (α -Gly), 18.8 (β -Ala).

Synthese des Tetrapeptids Ala-RbS-RbS-Ile (P13)



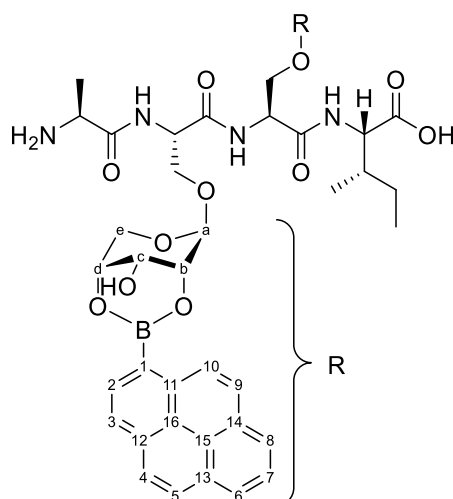
Das Peptid **P13** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptidsynthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc- und OAc-Schutzgruppen, erfolgte die Abspaltung vom Harz mit wässriger TFA (95 %ig).

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 12.68 (bs, 1H, COOH), 8.62 (d, $^3J_{\text{NH-RbS1}/\alpha\text{-H}} = 8.2$ Hz, 1H, NH-RbS(1)), 8.12 (d, $^3J_{\text{NH-RbS2}/\alpha\text{-H}} = 8.0$ Hz, 1H, NH-RbS(2)), 8.06 (bs, 3H, NH₃⁺-Ala), 8.06 - 8.05 (m, 1H, NH-Ile), 4.95, 4.82, 4.72 (3x bs, 6H, 2x 2,3,4-OH), 4.67 - 4.66 (m, 1H, α -RbS), 4.62 (2x d, $^3J_{1\text{H},2\text{H}} = 4.0$ Hz, 2H, 2x 1-CH), 4.17 (dd, $^3J_{\alpha\text{-Ile}/\beta\text{-H}} = 5.8$ Hz, $^3J_{\alpha\text{-Ile}/\text{NH}} = 8.3$ Hz, 1H, α -Ile), 3.92 (bs, 1H, α -Ala), 3.84 (dd, $^3J_{\beta\text{proR-RbS1}/\alpha\text{-H}} = 6.1$ Hz, $^2J = 10.3$ Hz, 1H, β -*proR*-RbS(1)), 3.76 (dd, $^3J_{\beta\text{proR-RbS2}/\alpha\text{-H}} = 6.1$ Hz, $^2J = 10.3$ Hz, 1H, β -*proR*-RbS(2)), 3.62 - 3.50 (m, 4H, 2x 5-CH₂), 3.56 (dd, $^3J_{\beta\text{proS-RbS1}/\alpha\text{-H}} = 4.5$ Hz, $^2J = 10.3$ Hz, 1H, β -*proS*-RbS(1)), 3.52 (dd, $^3J_{\beta\text{proS-RbS2}/\alpha\text{-H}} = 4.4$ Hz, $^2J = 10.2$ Hz, 1H, β -*proS*-RbS(2)), 3.41 (bs, 2H, 2x 2-CH), 1.79 - 1.73 (m, 1H, β -Ile), 1.43 - 1.37 (m, 1H, γ -CH₂-Ile), 1.35 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala), 1.19 - 1.13 (m, 1H, γ -CH₂-Ile), 0.85 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.5$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile), 0.85 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 6.9$ Hz, 3H, δ -Ile).

¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 172.6 (COOH), 169.5 (C=O-Ala), 168.7 (C=O-RbS(1)), 168.5 (C=O-RbS(2)), 157.9, 157.6 (C_q), 100.5 (2x 1-CH), 70.6, 70.5 (2x 2-CH), 68.7, 68.6 (2x 4-CH), 67.6, 67.4 (2x β -RbS), 66.5, 66.2 (2x 3-CH), 63.8 (2x 5-CH₂), 56.4 (α -Ile), 52.5, 52.2 (2x α -RbS), 48.0 (α -Ala), 36.5 (β -Ile), 24.6 (γ -CH₂-Ile), 17.3 (β -Ala), 15.4 (γ -Ile), 11.3 (δ -CH₃-Ile).

HR-MS (ESI): für C₂₅H₄₄N₄O₁₅Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 663.2695, gef.: 663.2688.

Boronsäureveresterung des Tetrapeptids Ala-RbS-RbS-Ile (P16)



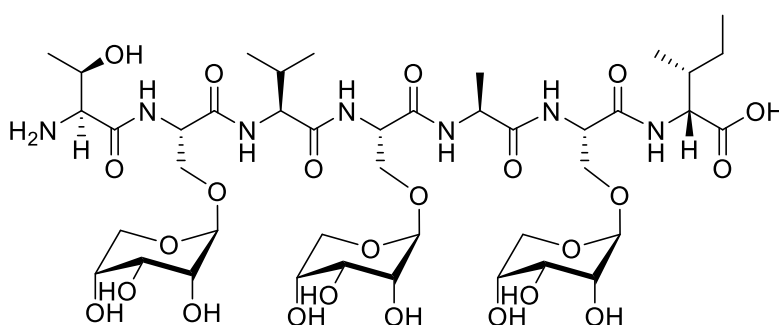
Das Tetrapeptid Ala-RbS-RbS-Ile (**P16**, 7.41 mg, 11.6 μmol , 1.00 eq) und Pyrenboronsäure (2.85 mg, 11.6 μmol , 1.00 eq) wurden in 0.60 mL DMSO-d_6 gelöst und nach 1 h NMR-spektroskopisch vermessen. Anschließend wurde ein weiteres Äquivalent der Pyrenboronsäure hinzugegeben, um beide Dirole vollständig zu verestern. Die Messung wurde nach 12 h wiederholt, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten.

^1H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 12.74 (bs, 1H, COOH), 9.03, 9.01 (2x d, $^3J_{10\text{H}/9\text{H}} = 9.3$ Hz, 2H, 2x 10-CH), 8.80 (d, $^3J_{\text{NH-RbS1}/\alpha\text{-H}} = 8.3$ Hz, 1H, NH-RbS¹), 8.47, 8.46 (2x d, 2H, 2x 2-CH), 8.42 (d, $^3J_{\text{NH-RbS2}/\alpha\text{-H}} = 8.2$ Hz, 1H, NH-RbS²), 8.32-8.29 (m, 4H, 2x 6-CH, 8-CH), 8.27-8.24 (m, 2H, 2x 3-CH), 8.23-8.19 (m, 4H, 2x 4-CH, 5-CH), 8.18-8.17 (m, 2H, 2x 9-CH), 8.12 (bs, 1H, NH-Ile), 8.10-8.05 (m, 2H, 2x 7-CH), 5.67, 5.61 (bs, 2H, 2x c-OH), 5.14, 5.13 (d, $^3J_{a\text{H},b\text{H}} = 2.7$ Hz, 2H, 2x a-CH), 4.88-4.83 (m, 2H, 2x α -RbS), 4.32 (bs, 2H, 2x d-CH), 4.28 (dd, $^3J_{\alpha\text{-Ile}/\beta\text{-H}} = 6.3$ Hz, $^3J_{\alpha\text{-Ile}/\text{NH}} = 8.5$ Hz, 1H, α -Ile), 4.25-4.23 (m, 2H, 2x c-CH), 4.13, 4.10 (bs, 2H, 2x b-CH), 4.05-4.00 (m, 1H, α -Ala), 3.99-3.94, 3.88-3.84 (m, 4H, 2x e-CH₂), 3.98-3.84 (m, 2H, 2x β -proR-RbS), 3.78-3.73 (m, 2H, 2x β -proS-RbS), 1.86-1.80 (m, 1H, β -Ile), 1.47-1.38 (m, 1H, γ -CH₂-Ile), 1.44 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala), 1.26-1.19 (m, 1H, γ -CH₂-Ile), 0.91 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 6.9$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.88 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.4$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

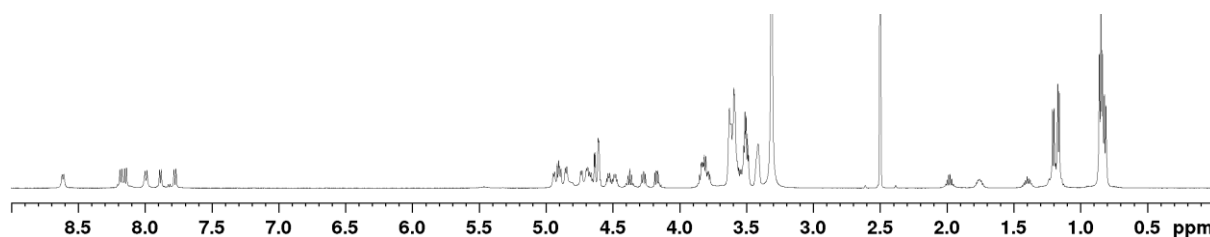
^{13}C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 172.7 (COOH), 169.7 (C=O-Ala), 168.7 (C=O-RbS¹), 168.4 (C=O-RbS²), 134.9, 133.9, 132.7, 132.3, 131.7, 131.4,

130.8, 130.7, 130.3, 130.2, 128.4, 128.2, 127.8, 127.6, 127.4, 127.2, 126.7, 126.1, 126.0, 125.3, 125.2, 124.9, 124.1, 124.0, 123.9, 123.7, 123.6 (Pyren-CH/C_q), 98.7, 98.5 (2x a-CH), 70.7, 70.6 (2x c/d-CH), 67.7, 67.4 (2x β-RbS), 63.7 (2x e-CH₂), 60.8 (2x b-CH), 56.5 (α-Ile), 52.3, 51.9 (2x α-RbS), 48.1 (α-Ala), 36.5 (β-Ile), 24.6 (γ-CH₂-Ile), 17.4 (β-Ala), 15.5 (γ-Ile), 11.3 (δ-CH₃-Ile).

Synthese des Heptapeptids Thr-RbS-Val-RbS-Ala-RbS-Ile (P14)



Das Heptapeptid **P14** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase (Kapitel 6.2.6) in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 2 h die Abspatlösung B verwendet.



¹H NMR: 600 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 8.61 (d, ³J_{NH-RbS/α-H} = 7.6 Hz, 1H, NH-RbS²), 8.18 (d, ³J_{NH-RbS/α-H} = 8.1 Hz, 1H, NH-RbS⁴), 8.14 (d, ³J_{NH-RbS/α-H} = 8.2 Hz, 1H, NH-RbS⁶), 7.99 (d, ³J_{NH-Val/α-H} = 8.7 Hz, 1H, NH-Val), 7.88 (d, ³J_{NH-Ala/α-H} = 7.4 Hz, 1H, NH-Ala), 7.77 (d, ³J_{NH-Ile/α-H} = 8.3 Hz, 1H, NH-Ile), 5.46 (bs, 1H, OH-Thr), 4.95-4.89 (m, 3H, 3x 4-OH), 4.86-4.80 (m, 3H, 3x 2-OH), 4.74-4.68 (m, 3H, 3x 3-OH), 4.67-4.65 (m, 1H, α-RbS), 4.64 (d, ³J_{1H/2H} = 3.9 Hz, 1H, 1-CH-RbS²), 4.61 (d, ³J_{1H/2H} = 3.8 Hz, 1H, 1-CH-RbS⁴), 4.60 (d, ³J_{1H/2H} = 4.0 Hz, 1H, 1-CH-RbS⁶), 4.55-4.51 (m, 1H, α-RbS⁶), 4.50-

Experimenteller Teil

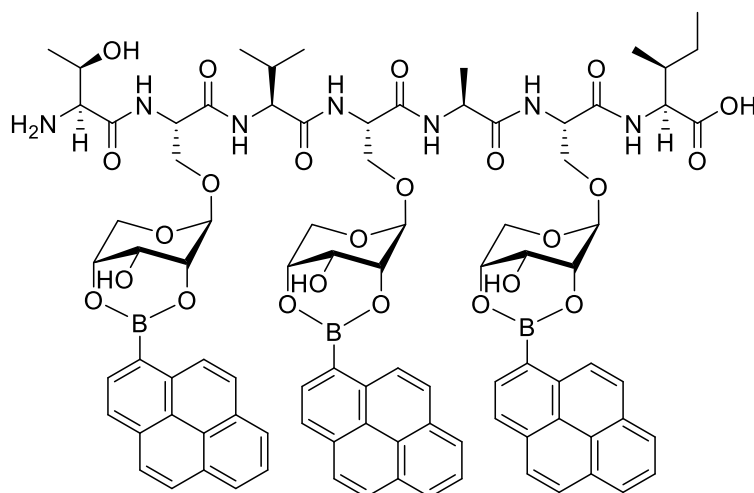
4.47 (m, 1H, α -RbS⁴), 4.38 (quin, $^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H}} = 7.1$ Hz, 1H, α -Ala), 4.27 (dd, $^3J_{\alpha\text{-Val}/\beta\text{-H}} = 6.5$ Hz, 1H, α -Val), 4.18 (dd, $^3J_{\alpha\text{-Ile}/\beta\text{-H}} = 5.7$ Hz, 1H, α -Ile), 3.87-3.84 (m, 1H, β -*proR*-RbS²), 3.85-3.83 (m, 1H, α -Thr), 3.83-3.80 (m, 1H, β -*proR*-RbS⁶), 3.80-3.77 (m, 1H, β -*proR*-RbS⁴), 3.64-3.63 (m, 3H, 3x 3-CH), 3.62-3.60 (m, 1H, β -Thr), 3.62-3.58 (m, 3H, 3x 5-*proR*-CH₂), 3.60-3.58 (m, 3H, 3x 4-CH), 3.56-3.54 (m, 1H, β -*proS*-RbS²), 3.53-3.51 (m, 1H, β -*proS*-RbS⁴), 3.52-3.48 (m, 3H, 3x 5-*proS*-CH₂), 3.51-3.49 (m, 1H, β -*proS*-RbS⁶), 3.44-3.40 (m, 3H, 3x 2-CH), 1.98 (sx, $^3J_{\beta\text{-Val}/\gamma\text{-H}} = 7.0$ Hz, 1H, β -Val), 1.79-1.73 (m, 1H, β -Ile), 1.44-1.37, 1.21-1.15 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.20 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.2$ Hz, 3H, β -Ala), 1.17 (d, $^3J_{\beta\text{-Thr}/\alpha\text{-H}} = 6.6$ Hz, 3H, γ -Thr), 0.86-0.85 (m, 3H, γ -Val), 0.85-0.84 (m, 3H, γ -Val), 0.82 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 7.0$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.81 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.4$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

Semipräp-HPLC: *Macherey-Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 10-70 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: $t_R = 3.67$ min, 10-70 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 97 %.

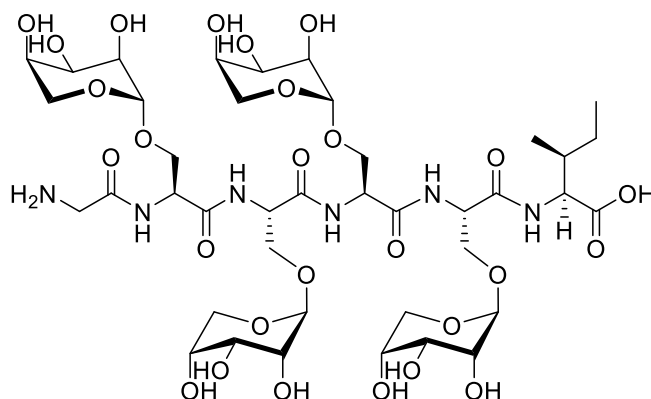
HR-MS (ESI): für C₄₂H₇₃N₇O₂₄H⁺ [M+H]⁺, ber.: 1060.4780, gef.: 1060.4778.

Boronsäureveresterung des Heptapeptids Thr-RbS-Val-RbS-Ala-RbS-Ile (P17)

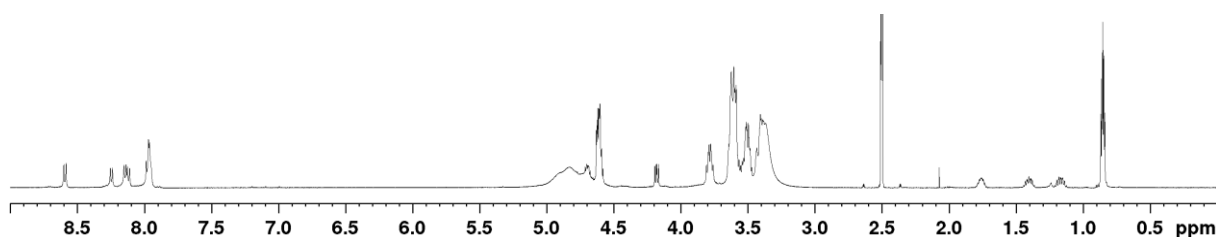


¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 9.00 (d, $^3J_{10H/9H} = 9.3$ Hz, 3H, 3x 10-CH), 8.74 (d, $^3J_{NH-RbS2/\alpha-H} = 7.5$ Hz, 1H, NH-RbS²), 8.44 (d, $^3J_{2H/3H} = 7.7$ Hz, 3H, 3x 2-CH), 8.38 (d, $^3J_{NH-RbS4/\alpha-H} = 7.8$ Hz, 1H, NH-RbS⁴), 8.31 (d, $^3J_{NH-RbS6/\alpha-H} = 8.0$ Hz, 1H, NH-RbS⁶), 8.30-8.27 (m, 6H, 3x 6-CH, 8-CH), 8.25-8.22 (m, 3H, 3x 3-CH), 8.22 (d, 1H, NH-Val), 8.20-8.16 (m, 6H, 3x 4-CH, 5-CH), 8.13-8.09 (m, 3H, 3x 9-CH), 8.11 (d, 1H, NH-Ala), 8.06-8.00 (m, 3H, 3x 7-CH), 8.01 (d, 1H, NH-Ile), 5.63, 5.60, 5.58 (bs, 3H, 3x c-OH), 5.15 (d, $^3J_{aH,bH} = 2.2$ Hz, 1H, a-CH-RbS²), 5.12 (d, $^3J_{aH,bH} = 2.0$ Hz, 1H, a-CH-RbS⁴), 5.09 (d, $^3J_{aH,bH} = 2.2$ Hz, 1H, a-CH-RbS⁶), 4.86-4.83 (m, 1H, α -RbS²), 4.74-4.71 (m, 1H, α -RbS⁶), 4.72-4.69 (m, 1H, α -RbS⁴), 4.51 (quin., $^3J_{\alpha H/NH} = 7.2$ Hz, 1H, α -Ala), 4.39 (dd, $^3J_{\alpha H/NH} = 8.2$ Hz, 1H, α -Val), 4.32-4.29 (m, 3H, 3x d-CH), 4.28-4.25 (m, 3H, 3x b-CH), 4.24 (dd, $^3J_{\alpha-Ile/\beta-H} = 5.8$ Hz, $^3J_{\alpha-Ile/NH} = 8.2$ Hz, 1H, α -Ile), 4.15-4.11 (m, 3H, 3x c-CH), 4.01-3.98, 3.75-3.73 (m, 2H, β -RbS⁴), 4.00-3.89 (m, 6H, 3x e-CH₂), 3.96-3.94, 3.78-3.75 (m, 2H, β -RbS²), 3.94-3.91, 3.71-3.68 (m, 2H, β -RbS⁶), 3.90-3.88 (m, 1H, α -Thr), 3.70-3.68 (m, 1H, β -Thr), 2.02-2.08 (m, 1H, β -Val), 1.83-1.77 (m, 1H, β -Ile), 1.46-1.40, 1.23-1.18 (m, 1H, γ -CH₂-Ile), 1.29 (d, $^3J_{\beta-Ala/\alpha-H} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala), 1.21 (d, $^3J_{\gamma-Thr/\beta-H} = 6.4$ Hz, 3H, γ -Thr), 0.95, 0.91 (2x d, $^3J_{\gamma-Val/\beta-H} = 6.8$ Hz, 6H, γ -Val), 0.89 (d, $^3J_{\delta-Ile/\gamma-CH_2} = 6.9$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.86 (t, $^3J_{\gamma-Ile/\beta-CH} = 7.4$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

Synthese des Hexapeptids Gly-RbS-RbS-RbS-RbS-Ile (P15)



Das Hexapeptid **P15** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase (Kapitel 6.2.6) in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 2 h die Abspatlösung B verwendet.



¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 8.59 (d, $^3J_{\text{NH-RbS}^2/\alpha\text{-H}} = 8.2$ Hz, 1H, NH-RbS²), 8.25 (d, $^3J_{\text{NH-RbS}^3/\alpha\text{-H}} = 8.0$ Hz, 1H, NH-RbS³), 8.14 (d, $^3J_{\text{NH-RbS}^4/\alpha\text{-H}} = 8.0$ Hz, 1H, NH-RbS⁴), 8.12 (d, $^3J_{\text{NH-RbS}^5/\alpha\text{-H}} = 8.1$ Hz, 1H, NH-RbS⁵), 7.98 (d, $^3J_{\text{NH-Val}/\alpha\text{-H}} = 8.3$ Hz, 1H, NH-Ile), 7.96 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.5$ Hz, 1H, NH-Gly), 4.98-4.72 (m, 12H, 4x 2,3,4-OH), 4.71-4.67 (m, 1H, α -RbS²), 4.63-4.61 (m, 2H, 2x 1-CH-RbS^{3,4}), 4.60-4.58 (m, 1H, 1-CH-RbS⁵), 4.18 (dd, $^3J_{\alpha\text{H}/\text{NH}} = 8.3$ Hz, $^3J_{\alpha\text{H}/\beta\text{H}} = 5.8$ Hz, 1H, α -Ile), 4.81-4.76 (m, 3H, 3x α -RbS^{3,4,5}), 4.65-4.63 (m, 1H, α -RbS²), 3.63-3.62 (m, 4H, 4x 3-CH), 3.63-3.59 (m, 2H, α -Gly), 3.62-3.58 (m, 4H, 4x 5-*proR*-CH₂), 3.58-3.51 (m, 8H, 4x β -RbS), 3.53-3.48 (m, 4H, 4x 5-*proS*-CH₂), 3.62-3.60 (m, 4H, 4x 4-CH), 3.43-3.40 (m, 4H, 4x 2-CH), 1.78-1.73 (m, 1H, β -Ile), 1.43-1.37, 1.20-1.14 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 0.86 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 7.0$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.85 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.4$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

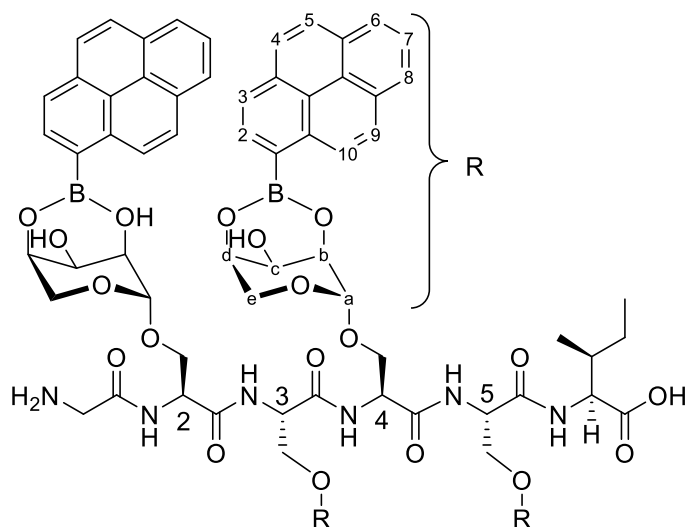
Semipräp-HPLC: Macherey-Nagel Nucleodur, C18, 5 μm , 5-30 % B in 30 min, 15 mL/min.

Experimenteller Teil

HPLC: $t_R = 5.36$ min, 5-30 % B in 10 min, 0.60 mL/min, *ACE 3, C18*, 3 μm , 150 x 3 mm, (Reinheit: 99 %).

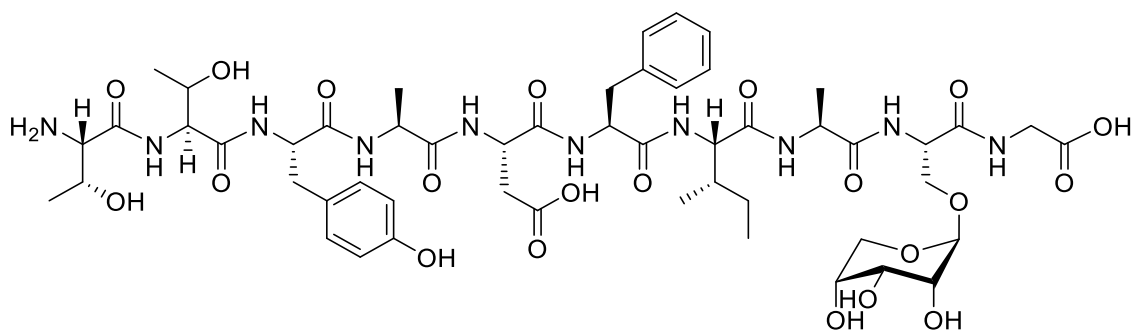
HR-MS (ESI): für $\text{C}_{40}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{27}\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 1087.4025, gef.: 1087.4026.

Boronsäureveresterung des Hexapeptids Gly-RbS-RbS-RbS-RbS-Ile (P18)

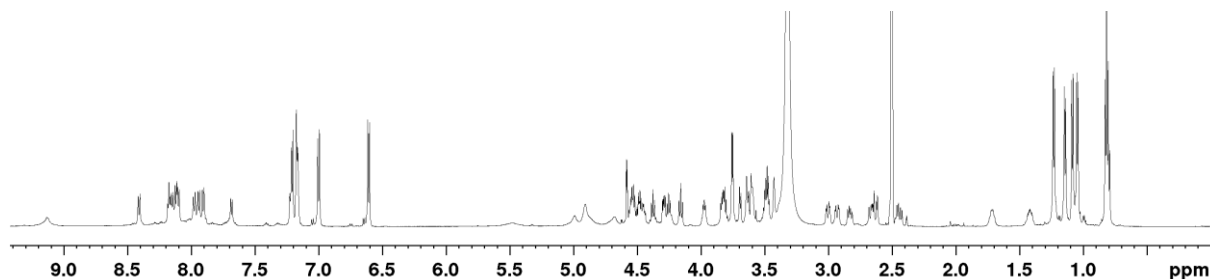


¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 9.02, 9.01, 9.00 (4x d, $^3J_{10H/9H}$ = 9.3 Hz, 4H, 4x 10-CH), 8.78 (d, $^3J_{NH-RbS2/\alpha-H}$ = 8.3 Hz, 1H, NH-RbS²), 8.65 (d, $^3J_{NH-RbS3/4/\alpha-H}$ = 8.3 Hz, 1H, NH-RbS^{3/4}), 8.56 (d, $^3J_{NH-RbS3/4/\alpha-H}$ = 8.3 Hz, 1H, NH-RbS^{3/4}), 8.47 (d, $^3J_{NH-RbS5/\alpha-H}$ = 8.0 Hz, 1H, NH-RbS⁵), 8.45, 8.43 (d, $^3J_{2H/3H}$ = 7.7 Hz, 4H, 4x 2-CH), 8.28 (d, 1H, NH-Ile), 8.30-8.26 (m, 8H, 4x 6-CH, 8-CH), 8.26-8.23 (m, 4H, 4x 3-CH), 8.22-8.16 (m, 8H, 4x 4-CH, 5-CH), 8.15-8.10 (m, 4H, 4x 9-CH), 8.05-8.00 (m, 4H, 4x 7-CH), 5.65, 5.62, 5.58 (bs, 4H, 4x c-OH), 5.20 (d, $^3J_{aH,bH}$ = 2.3 Hz, 1H, a-CH-RbS²), 5.19 (d, $^3J_{aH,bH}$ = 2.3 Hz, 1H, a-CH-RbS^{3/4}), 5.15 (d, $^3J_{aH,bH}$ = 2.0 Hz, 1H, a-CH-RbS^{3/4}), 5.13 (d, $^3J_{aH,bH}$ = 2.1 Hz, 1H, a-CH-RbS⁵), 4.00-4.96 (m, 1H, α -RbS²), 4.95-4.92 (m, 1H, α -RbS^{3/4}), 4.91-4.88 (m, 1H, α -RbS^{3/4}), 4.87-4.83 (m, 1H, α -RbS⁵), 4.37-4.34 (m, 4H, 4x d-CH), 4.32-4.30 (m, 4H, 4x b-CH), 4.29-4.27 (m, 1H, α -Ile), 4.17-4.14 (m, 4H, 4x c-CH), 4.02-3.91 (m, 8H, 4x e-CH₂), 3.98-3.96, 3.84-3.82 (m, 2H, β -RbS²), 3.97-3.87, 3.79-3.72 (m, 4H, β -RbS^{3/4}), 3.95-3.93, 3.76-3.74 (m, 2H, β -RbS⁵), 3.74-3.71 (m, 2H, α -Gly), 1.85-1.79 (m, 1H, β -Ile), 1.48-1.43, 1.26-1.20 (m, 1H, γ -CH₂-Ile), 0.90 (d, $^3J_{\delta-Ile/\gamma-CH_2}$ = 6.8 Hz, 3H, δ -Ile), 0.86 (t, $^3J_{\gamma-Ile/\beta-CH}$ = 7.4 Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

Synthese des Decapeptids Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-RbS-Gly (P19)



Das Peptid **P19** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptidsynthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc- und OAc-Schutzgruppen, erfolgte die Abspaltung vom Harz mit der Abspatlösung B.



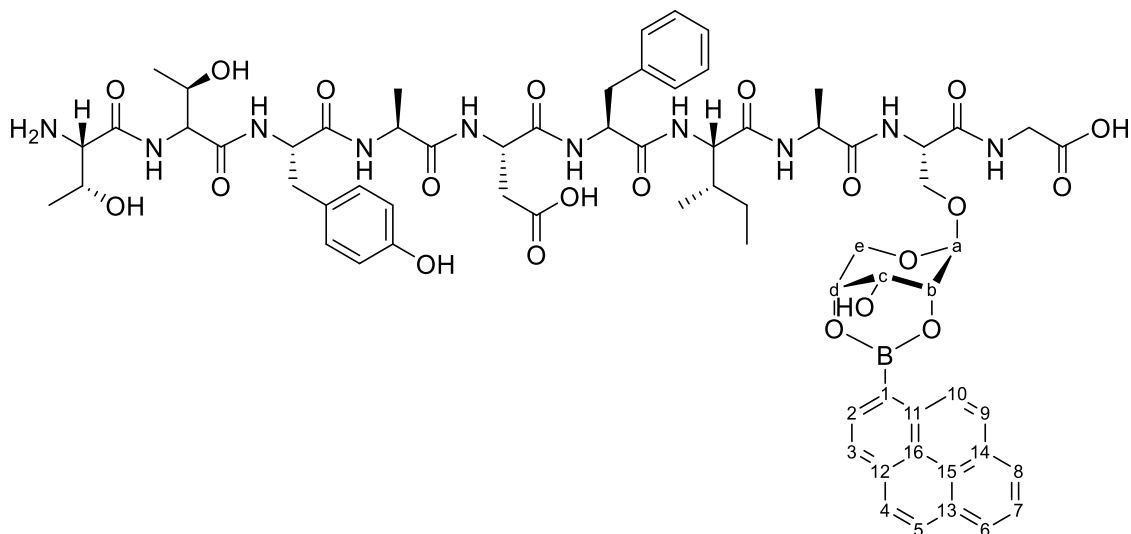
¹H NMR: 600 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 12.29 (bs, 1H, COOH), 9.13 (bs, 1H, OH-Tyr), 8.41 (d, $^3J_{\text{NH-Thr}/\alpha\text{-H}} = 8.3$ Hz, 1H, NH-Thr⁶), 8.18 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.8$ Hz, 1H, NH-Gly), 8.15 (d, $^3J_{\text{NH-Asp}/\alpha\text{-H}} = 7.8$ Hz, 1H, NH-Asp), 8.12 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.2$ Hz, 1H, NH-Ala¹²), 8.10 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.4$ Hz, 1H, NH-Ala⁸), 7.97 (d, $^3J_{\text{NH-Ile}/\alpha\text{-H}} = 8.9$ Hz, 1H, NH-Ile), 7.94 (d, $^3J_{\text{NH-Tyr}/\alpha\text{-H}} = 7.9$ Hz, 1H, NH-Tyr), 7.91 (d, $^3J_{\text{NH-RbS}/\alpha\text{-H}} = 8.3$ Hz, 1H, NH-RbS), 7.69 (d, $^3J_{\text{NH-Phe}/\alpha\text{-H}} = 7.9$ Hz, 1H, NH-Phe), 7.23-7.16 (m, 5H, 5x CH_{aromat.}-Phe), 7.00 (d, $^3J_{2,6\text{-Tyr}/3,5\text{-H}} = 8.5$ Hz, 2H, 2x 2,6-Tyr), 6.61 (d, $^3J_{3,5\text{-Tyr}/2,6\text{-H}} = 8.5$ Hz, 2H, 2x 3,5-Tyr), 4.99 (bs, 1H, 2-OH), 4.91 (bs, 1H, 4-OH), 4.68 (bs, 1H, 3-OH), 4.58 (d, $^3J_{1\text{H},2\text{H}} = 3.8$ Hz, 1H, 1-CH), 4.56-4.54 (m, 1H, α-Phe), 4.53-4.51 (m, 1H, α-Asp), 4.50-4.47 (m, 1H, α-RbS), 4.46-4.43 (m, 1H, α-Tyr), 4.38 (q, $^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H},\text{NH}} = 7.0$ Hz, 1H, α-Ala¹²), 4.29 (dd, $^3J_{\beta\text{-Thr}/\alpha\text{-H},\gamma\text{-H}} = 4.4, 8.4$ Hz, 1H, α-Thr⁶), 4.25 (q, $^3J_{\alpha\text{-Ala}/\beta\text{-H},\text{NH}} = 7.2$ Hz, 1H, α-Ala⁸), 4.16 (t, $^3J_{\alpha\text{-Ile}/\beta\text{-H},\text{NH}} = 8.3$ Hz, 1H, α-Ile), 3.99-3.96 (m, 1H, β-Thr⁶), 3.83 (dd, $^3J_{\beta\text{proR-RbS}/\alpha\text{-H}} = 5.3$ Hz, $^2J = 10.1$ Hz, 1H, β-proR-RbS), 3.81 (t, $^3J_{\beta\text{-Thr}/\alpha\text{-H},\gamma\text{-H}} = 4.4$ Hz, 1H, α-Thr⁵), 3.75 (d, $^3J_{\text{Gly}/\text{NH}} = 5.9$ Hz, 2H, α-Gly), 3.70-

3.69 (m, 1H, β -Thr⁵), 3.64 (t, $^3J_{3H/2H,4H} = 3.0$ Hz, 1H, 3-CH), 3.63-3.61 (m, 1H, 5-*proR*-CH₂), 3.61 (bs, 1H, 4-CH), 3.51-3.48 (m, 1H, 5-*proS*-CH₂), 3.48 (dd, $^3J_{\beta\text{proS-RbS}/\alpha\text{-H}} = 4.9$ Hz, $^2J = 10.0$ Hz, 1H, β -*proS*-RbS), 3.43 (t, $^3J_{2H/1H,3H} = 3.5$ Hz, 1H, 2-CH), 3.01 (dd, $^3J_{\beta\text{-Phe}/\alpha\text{-H}} = 4.6$ Hz, $^2J = 13.9$ Hz, 1H, β -Phe), 2.93 (dd, $^3J_{\beta\text{-Tyr}/\alpha\text{-H}} = 4.0$ Hz, $^2J = 14.4$ Hz, 1H, β -Tyr), 2.83 (dd, $^3J_{\beta\text{-Phe}/\alpha\text{-H}} = 8.1$ Hz, $^2J = 13.9$ Hz, 1H, β -Phe), 2.93 (dd, $^3J_{\beta\text{-Tyr}/\alpha\text{-H}} = 9.5$ Hz, $^2J = 14.4$ Hz, 1H, β -Tyr), 2.63 (dd, $^3J_{\beta\text{-Asp}/\alpha\text{-H}} = 5.8$ Hz, $^2J = 16.7$ Hz, 1H, β -Asp), 2.44 (dd, $^3J_{\beta\text{-Asp}/\alpha\text{-H}} = 7.9$ Hz, $^2J = 16.7$ Hz, 1H, β -Asp), 1.74-1.69 (m, 1H, β -Ile), 1.44-1.40, 1.24-1.21 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.23 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.1$ Hz, 3H, β -Ala¹²), 1.14 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.1$ Hz, 3H, β -Ala⁸), 1.08 (d, $^3J_{\beta\text{-Thr}/\alpha\text{-H}} = 6.4$ Hz, 3H, γ -Thr⁵), 1.04 (d, $^3J_{\beta\text{-Thr}/\alpha\text{-H}} = 6.3$ Hz, 3H, γ -Thr⁶), 0.82 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 6.9$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.80 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.4$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

¹³C NMR: 150 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 172.0, 171.7, 170.9, 170.8, 170.6, 170.1, 169.4 (C=O), 157.8, 157.6, 157.6 (C_q), 155.7 (4-C_q-Tyr), 137.3 (1-C_q-Phe), 130.0 (2,6-CH-Tyr), 129.3, 127.9 (2,3,5,6-CH-Phe), 127.7 (1-C_q-Tyr), 126.2 (4-CH-Phe), 114.8 (3,5-CH-Tyr), 100.7 (1-CH), 70.6 (2-CH), 68.8 (4-CH), 67.6 (β -RbS), 66.8 (β -Thr⁶), 66.2 (3-CH), 66.0 (α -Thr⁵), 63.8 (5-CH₂), 58.0 (β -Thr⁵), 57.8 (α -Thr⁶), 56.7 (α -Ile), 54.1 (α -Tyr), 53.4 (α -Phe), 52.2 (α -RbS), 49.5 (α -Asp), 48.1 (α -Ala¹²), 48.0 (α -Ala⁸), 40.8 (α -Gly), 37.3 (β -Phe), 36.5 (β -Ile), 36.3 (β -Tyr), 36.1 (β -Asp), 24.3 (γ -CH₂-Ile), 19.6 (γ -Thr⁵), 19.2 (γ -Thr⁶), 18.2 (β -Ala⁸), 17.8 (β -Ala¹²), 15.2 (γ -Ile), 10.9 (δ -CH₃-Ile).

HR-MS (ESI): für C₅₂H₇₆N₁₀O₂₁H₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 589.2691, gef.: 589.2666.

Boronsäureveresterung des Decapeptids Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-RbS-Gly (P68)



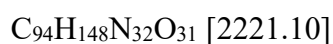
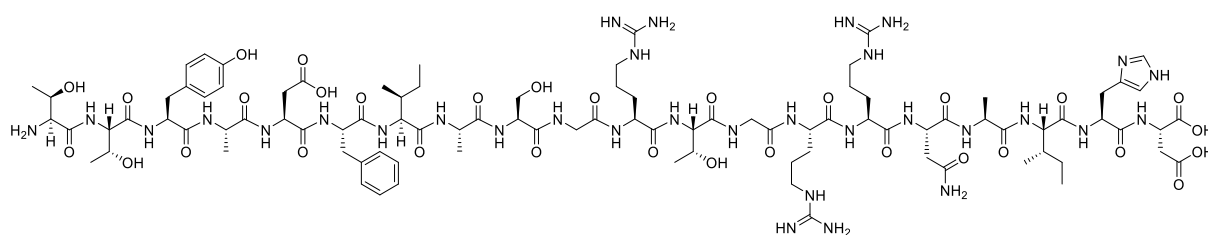
Das Decapeptid Thr-Thr-Tyr-Ala-Asp-Phe-Ile-Ala-RbS-Gly (**P68**, 5.00 mg, 4.25 μmol , 1.00 eq) und Pyrenboronsäure (1.04 mg, 4.25 μmol , 1.00 eq) wurden in 0.60 mL DMSO-d_6 gelöst und nach 20 min NMR-spektroskopisch vermessen. Die Messung wurde nach 12 h wiederholt, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten.

^1H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 12.32 (bs, 1H, COOH), 9.13 (bs, 1H, OH-Tyr), 9.01 (d, $^3J_{10\text{H}/9\text{H}} = 9.3$ Hz, 1H, 10-CH), 8.45 (d, $^3J_{2\text{H}/3\text{H}} = 7.7$ Hz 2H, 2-CH), 8.40 (d, $^3J_{\text{NH-Thr}/\alpha\text{-H}} = 8.4$ Hz, 1H, NH-Thr⁶), 8.33-8.31 (m, 1H, NH-Gly), 8.32-8.30 (m, 2H, 6-CH, 8-CH), 8.26 (d, $^3J_{3\text{H}/2\text{H}} = 7.8$ Hz, 1H, 3-CH), 8.24-8.22 (m, 2H, 4-CH, 5-CH), 8.20-8.19 (m, 1H, 9-CH), 8.18 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.4$ Hz, 1H, NH-Ala¹²), 8.17 (d, $^3J_{\text{NH-Asp}/\alpha\text{-H}} = 7.9$ Hz, 1H, NH-Asp), 8.09 (d, $^3J_{\text{NH-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.4$ Hz, 1H, NH-Ala⁸), 8.08-8.07 (m, 1H, 7-CH), 8.03 (d, $^3J_{\text{NH-RbS}/\alpha\text{-H}} = 8.5$ Hz, 1H, NH-RbS), 8.00 (d, $^3J_{\text{NH-Ile}/\alpha\text{-H}} = 8.9$ Hz, 1H, NH-Ile), 7.94 (d, $^3J_{\text{NH-Tyr}/\alpha\text{-H}} = 7.9$ Hz, 1H, NH-Tyr), 7.69 (d, $^3J_{\text{NH-Phe}/\alpha\text{-H}} = 7.9$ Hz, 1H, NH-Phe), 7.23-7.17 (m, 5H, 5x CH_{aromat.}-Phe), 7.00 (d, $^3J_{2,6\text{-Tyr}/3,5\text{-H}} = 8.4$ Hz, 2H, 2x 2,6-Tyr), 6.61 (d, $^3J_{3,5\text{-Tyr}/2,6\text{-H}} = 8.4$ Hz, 2H, 2x 3,5-Tyr), 5.56 (bs, 1H, 3-OH), 5.03 (d, $^3J_{1\text{H},2\text{H}} = 1.4$ Hz, 1H, a-CH), 4.63-4.60 (m, 1H, α -RbS), 4.59-4.54 (m, 1H, α -Phe), 4.54-4.52 (m, 1H, α -Asp), 4.48-4.45 (m, 1H, α -Tyr), 4.45-4.43 (m, 1H, α -Ala¹²), 4.30-4.28 (m, 1H, α -Thr⁶), 4.29 (bs, 1H, d-CH), 4.27-4.24 (m, 1H, α -Ala⁸), 4.24 (bs, 1H, b-CH), 4.19 (t, $^3J_{\alpha\text{-Ile}/\beta\text{-H},\text{NH}} = 8.3$ Hz, 1H, α -Ile), 4.15 (bs, 1H, c-CH), 3.98-3.96 (m, 1H, β -Thr⁶), 3.97-3.94 (m, 1H, e-CH₂), 3.95-3.92

(m, 1H, β -*proR*-RbS), 3.85-3.82 (m, 1H, e-CH₂), 3.82-3.80 (m, 2H, α -Gly), 3.81-3.79 (m, 1H, α -Thr⁵), 3.70-3.69 (m, 1H, β -Thr⁵), 3.65 (dd, $^3J_{\beta\text{proS-RbS}/\alpha\text{-H}} = 4.2$ Hz, $^2J = 9.8$ Hz, 1H, β -*proS*-RbS), 3.02 (dd, $^3J_{\beta\text{-Phe}/\alpha\text{-H}} = 4.5$ Hz, $^2J = 13.8$ Hz, 1H, β -Phe), 2.93 (dd, $^3J_{\beta\text{-Tyr}/\alpha\text{-H}} = 3.5$ Hz, $^2J = 14.0$ Hz, 1H, β -Tyr), 2.86 (dd, $^3J_{\beta\text{-Phe}/\alpha\text{-H}} = 8.0$ Hz, $^2J = 13.8$ Hz, 1H, β -Phe), 2.66 (dd, $^3J_{\beta\text{-Tyr}/\alpha\text{-H}} = 9.0$ Hz, $^2J = 13.9$ Hz, 1H, β -Tyr), 2.64 (dd, $^3J_{\beta\text{-Asp}/\alpha\text{-H}} = 5.7$ Hz, $^2J = 16.5$ Hz, 1H, β -Asp), 2.45 (dd, $^3J_{\beta\text{-Asp}/\alpha\text{-H}} = 7.8$ Hz, $^2J = 16.5$ Hz, 1H, β -Asp), 1.78-1.63 (m, 1H, β -Ile), 1.48-1.43, 1.26-1.23 (2x m, 2H, γ -CH₂-Ile), 1.27 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.1$ Hz, 3H, β -Ala¹²), 1.15 (d, $^3J_{\beta\text{-Ala}/\alpha\text{-H}} = 7.0$ Hz, 3H, β -Ala⁸), 1.08 (d, $^3J_{\beta\text{-Thr}/\alpha\text{-H}} = 6.2$ Hz, 3H, γ -Thr⁵), 1.04 (d, $^3J_{\beta\text{-Thr}/\alpha\text{-H}} = 6.3$ Hz, 3H, γ -Thr⁶), 0.87 (d, $^3J_{\delta\text{-Ile}/\gamma\text{-CH}_2} = 6.7$ Hz, 3H, δ -Ile), 0.83 (t, $^3J_{\gamma\text{-Ile}/\beta\text{-CH}} = 7.5$ Hz, 3H, γ -CH₃-Ile).

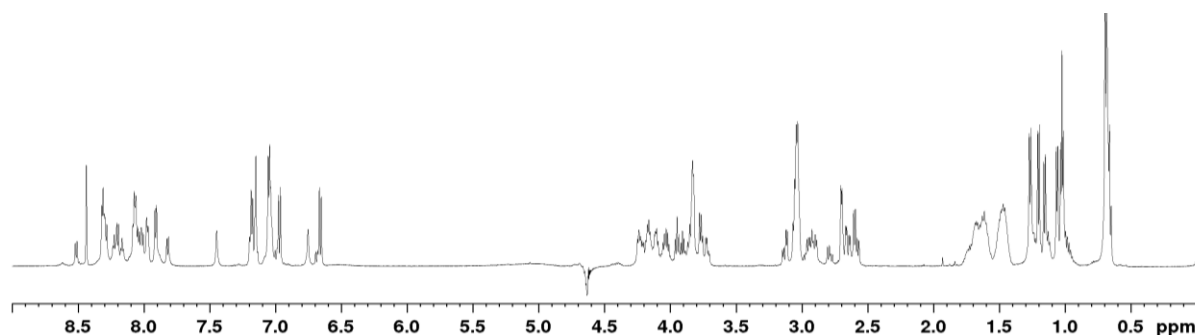
6.6 Synthese der PKI-Peptide mit glykosylierten Bausteinen

Synthese des Peptids P23 - PKI⁵⁻²⁴



Das Peptid **P23** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur manuellen Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 285 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.6)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

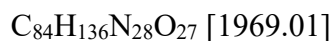
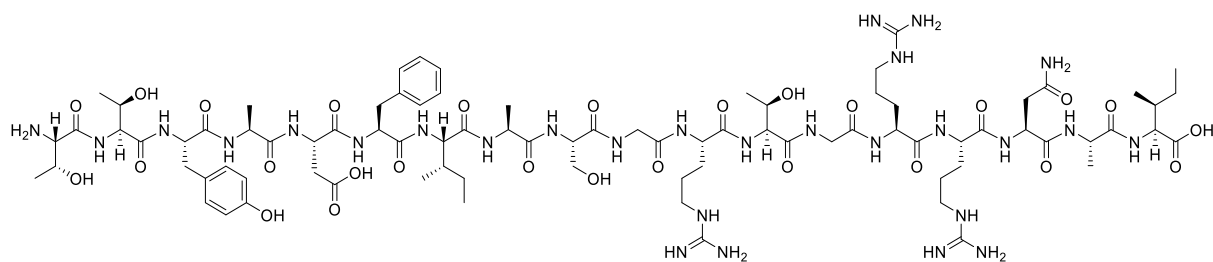
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|--|----------------------------|
| 5 | Thr | n.n. | 3.89 | 3.76 | H γ | 1.00 |
| 6 | Thr | 8.47 | 4.23 | 4.01 | H γ | 1.02 |
| 7 | Tyr | 8.29 | 4.39 | 2.91, 2.77 | 2,6-H 3,5-H | 6.97 6.66 |
| 8 | Ala | 8.09 | 4.05 | 1.15 | | |
| 9 | Asp | 8.01 | | 2.73 | | |
| 10 | Phe | 7.91 | 4.41 | 2.96, 2.90 | 2,4,6-H 3,5-H | 7.18 7.03 |
| 11 | Ile | 7.82 | 3.86 | 1.59 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.68 1.13, 0.98 0.66 |
| 12 | Ala | 8.08 | 4.10 | 1.26 | | |
| 13 | Ser | 8.03 | 4.25 | 3.76, 3.71 | | |
| 14 | Gly | 8.19 | 3.83 | | | |
| 15 | Arg | 8.05 | 4.24 | 1.65 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.46 3.04 7.05 |
| 16 | Thr | 7.98 | 4.21 | 4.11 | H γ | 1.06 |
| 17 | Gly | 8.23 | 3.83 | | | |
| 18 | Arg | 8.06 | 4.17 | 1.65 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.46 3.04 7.05 |
| 19 | Arg | 8.31 | 4.17 | 1.65 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.46 3.04 7.05 |
| 20 | Asn | 8.30 | 4.51 | 2.69, 2.61 | NH ₂ | 7.44, 6.75 |
| 21 | Ala | 8.07 | 4.16 | 1.20 | | |
| 22 | Ile | 7.90 | 3.94 | 1.75 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.69 1.24, 1.09 0.68 |
| 23 | His | 8.34 | | 3.12, 3.04 | 5-H 2-H | 7.15 8.44 |
| 24 | Asp | 8.25 | 4.56 | 2.67, 2.58 | | |

SemiSemipräp-HPLC: ACE 5, C18, 5 μ m, 7.75 x 150 mm, 15-35 % B in 30 min, 2.8 mL/min.

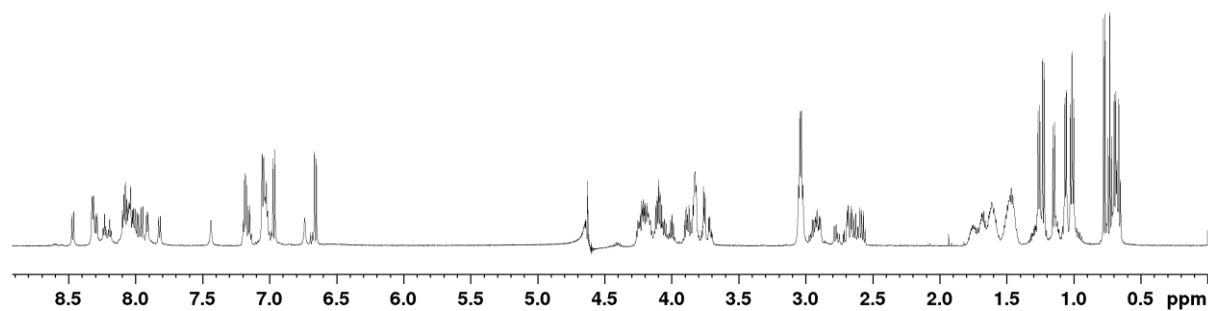
HPLC: t_R = 11.63 min, 15-35 % B in 20 min, 0.42 mL/min, ACE 3, C18, 3 μ m, 3 x 150 mm, Reinheit: 94 %.

HR-MS (ESI): für C₉₄H₁₄₈N₃₂O₃₁H₂²⁺ [M+2H]²⁺ ber.: 1111.5567, gef.: 1111.5572.

Synthese des Peptids P24 - PKI⁵⁻²²



Das Peptid **P24** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 285 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.6)/D₂O 9:1))

Experimenteller Teil

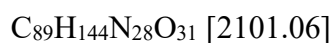
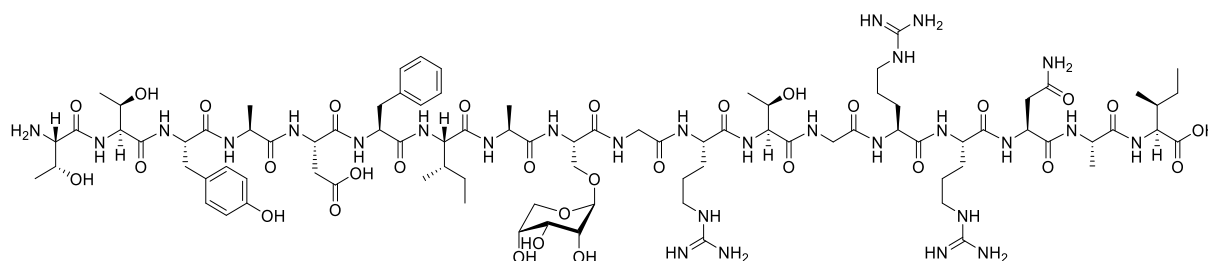
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|---------------|--|----------------------------|
| 5 | Thr | n.n. | 3.89 | 3.75 | H γ | 1.00 |
| 6 | Thr | 8.57 | 4.21 | 4.01 | H γ | 1.03 |
| 7 | Tyr | 8.45 | 4.39 | 2.90, 2.78 | 2,6-H 3,5-H | 6.97 6.65 |
| 8 | Ala | 8.22 | 4.04 | 1.16 | | |
| 9 | Asp | 8.11 | 4.46 | 2.71, 2.64 | | |
| 10 | Phe | 8.02 | 4.40 | 2.95, 2.91 | 2,4,6-H 3,5-H | 7.16 7.04 |
| 11 | Ile | 7.94 | 3.84 | 1.60 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.68 1.23, 0.96 0.66 |
| 12 | Ala | 8.18 | 4.09 | 1.27 | | |
| 13 | Ser | 8.13 | 4.24 | 3.76, 3.71 | | |
| 14 | Gly | 8.26 | 3.83 | | | |
| 15 | Arg | 8.15 | 4.24 | 1.70, 1.60 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.04 7.08 |
| 16 | Thr | 8.09 | 4.20 | 4.12 | H γ | 1.06 |
| 17 | Gly | 8.33 | 3.83 | | | |
| 18 | Arg | 8.14 | 4.17 | 1.70, 1.60 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.04 7.08 |
| 19 | Arg | 8.44 | 4.15 | 1.70, 1.60 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.04 7.08 |
| 20 | Asn | 8.43 | 4.51 | 2.67, 2.57 | NH ₂ | 7.53, 6.82 |
| 21 | Ala | 8.19 | 4.18 | 1.23 | | |
| 22 | Ile | 7.95 | 4.08 | 1.76 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.77 1.30, 1.13 0.73 |

SemiSemipräp-HPLC: ACE 5, C18, 5 μ m, 7.75 x 150 mm, 15-35 % B in 30 min, 2.8 mL/min.

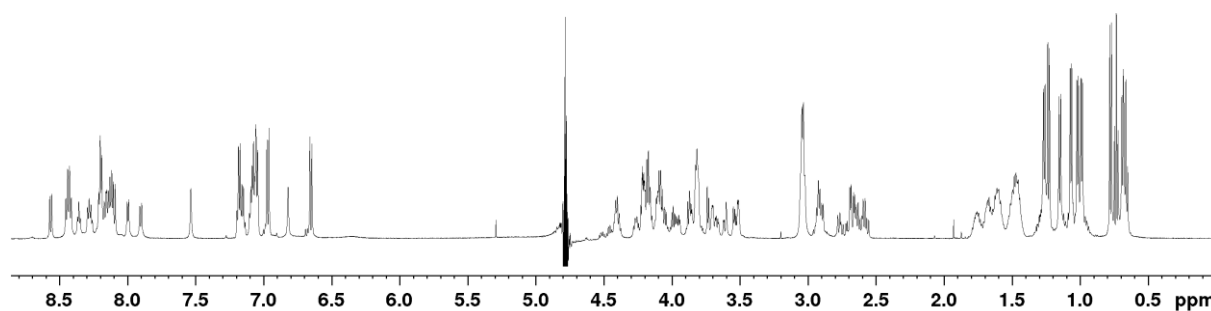
HPLC: t_R = 13.29 min, 15-35 % B in 20 min, 0.42 mL/min, ACE 3, C18, 3 μ m, 3 x 150 mm, Reinheit: > 99 %.

HR-MS (ESI): für C₈₄H₁₃₆N₂₈O₂₇H₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 985.5138, gef.: 985.5152.

Synthèse des Peptids P25 - PKI(RbS¹³)⁵⁻²²



Das Peptid **P25** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 285 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.6)/D₂O 9:1))

Experimenteller Teil

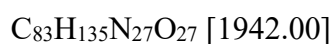
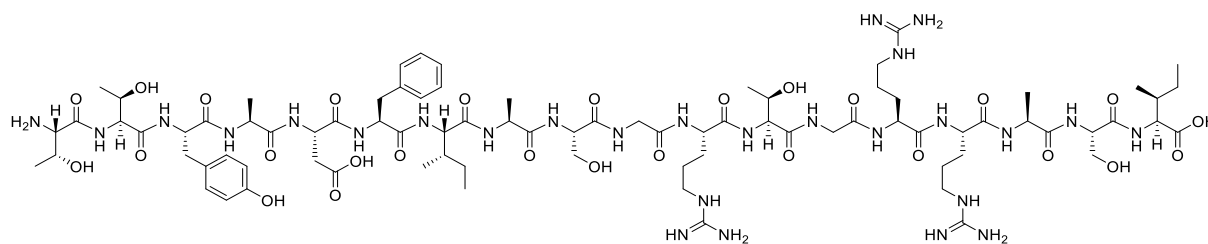
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|--|--|
| 5 | Thr | n.n. | 3.88 | 3.74 | H γ | 0.99 |
| 6 | Thr | 8.57 | 4.22 | 3.99 | H γ | 1.02 |
| 7 | Tyr | 8.42 | 4.39 | 2.90, 2.76 | 2,6-H 3,5-H | 6.97 6.66 |
| 8 | Ala | 8.21 | 4.05 | 1.15 | | |
| 9 | Asp | 8.12 | 4.46 | 2.70, 2.62 | | |
| 10 | Phe | 8.00 | 4.40 | 2.94 | 2,4,6-H 3,5-H | 7.17 7.05 |
| 11 | Ile | 7.91 | 3.86 | 1.60 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.68 1.23, 0.96 0.66 |
| 12 | Ala | 8.29 | 4.09 | 1.26 | | |
| 13 | RbS | 8.28 | 4.42 | 3.96, 3.67 | 1-CH 2-CH 3-CH 4-CH 5-CH ₂ | 4.63 3.51 3.81 3.70 3.61, 3.53 |
| 14 | Gly | 8.27 | 3.82 | | | |
| 15 | Arg | 8.17 | 4.26 | 1.69, 1.61 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.03 7.08 |
| 16 | Thr | 8.13 | 4.20 | 4.11 | H γ | 1.07 |
| 17 | Gly | 8.36 | 3.82 | | | |
| 18 | Arg | 8.15 | 4.18 | 1.69, 1.61 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.03 7.08 |
| 19 | Arg | 8.45 | 4.16 | 1.69, 1.61 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.03 7.08 |
| 20 | Asn | 8.43 | 4.52 | 2.67, 2.58 | NH ₂ | 7.53, 6.82 |
| 21 | Ala | 8.18 | 4.18 | 1.23 | | |
| 22 | Ile | 8.10 | 4.07 | 1.75 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.78 1.30, 1.10 0.73 |

SemiSemipräp-HPLC: ACE 5, C18, 5 μ m, 7.75 x 150 mm, 15-35 % B in 30 min, 2.8 mL/min.

HPLC: t_R = 12.87 min, 15-35 % B in 20 min, 0.42 mL/min, ACE 3, C18, 3 μ m, 3 x 150 mm, Reinheit: 97 %.

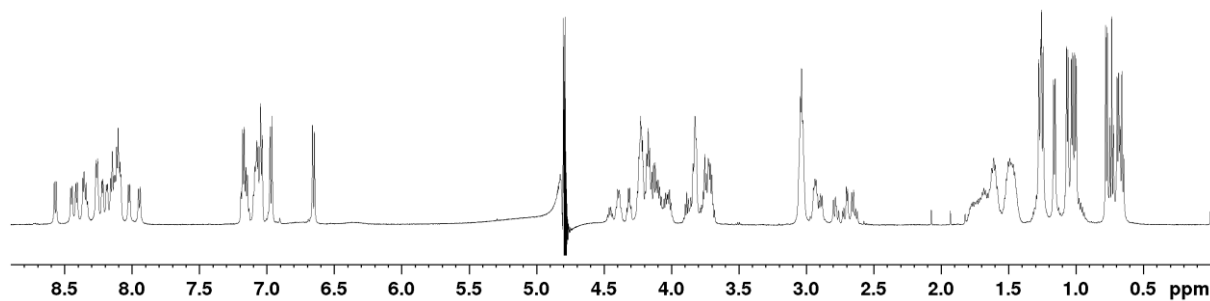
HR-MS (ESI): für C₈₉H₁₄₄N₂₈O₃₁H₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 1052.0367, gef.: 1052.0363.

Synthese des Peptids P20 - PKA⁵⁻²²



Das Peptid **P20** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 285 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.6)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

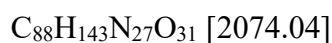
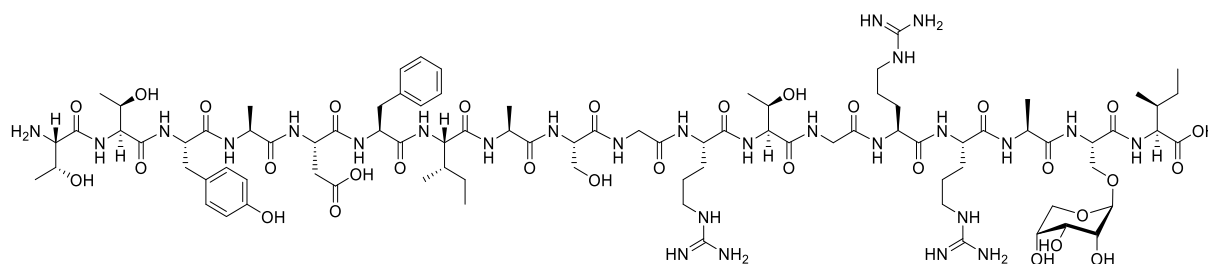
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 5 | Thr | n.n. | 3.88 | 3.75 | H γ | 1.00 |
| 6 | Thr | 8.57 | 4.22 | 4.01 | H γ | 1.03 |
| 7 | Tyr | 8.45 | 4.39 | 2.90, 2.78 | 2,6-H | 6.97 |
| | | | | | 3,5-H | 6.65 |
| 8 | Ala | 8.22 | 4.05 | 1.16 | | |
| 9 | Asp | 8.11 | 4.45 | 2.71, 2.64 | | |
| 10 | Phe | 8.02 | 4.39 | 2.95, 2.92 | 2,4,6-H | 7.15 |
| | | | | | 3,5-H | 7.04 |
| 11 | Ile | 7.95 | 3.85 | 1.60 | H γ -CH ₃ | 0.69 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.25, 0.96 |
| | | | | | H δ | 0.66 |
| 12 | Ala | 8.18 | 4.08 | 1.27 | | |
| 13 | Ser | 8.14 | 4.24 | 3.77, 3.73 | | |
| 14 | Gly | 8.26 | 3.83 | | | |
| 15 | Arg | 8.15 | 4.23 | 1.68, 1.60 | H γ | 1.48 |
| | | | | | H δ | 3.03 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.08 |
| 16 | Thr | 8.09 | 4.21 | 4.11 | H γ | 1.06 |
| 17 | Gly | 8.34 | 3.83 | | | |
| 18 | Arg | 8.12 | 4.15 | 1.68, 1.61 | H γ | 1.48 |
| | | | | | H δ | 3.03 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.08 |
| 19 | Arg | 8.41 | 4.15 | 1.68, 1.61 | H γ | 1.48 |
| | | | | | H δ | 3.03 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.08 |
| 20 | Ala | 8.36 | 4.19 | 1.25 | | |
| 21 | Ser | 8.26 | 4.32 | 3.72, 3.69 | | |
| 22 | Ile | 7.94 | 4.14 | 1.78 | H γ -CH ₃ | 0.77 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.30, 1.04 |
| | | | | | H δ | 0.73 |

SemiSemipräp-HPLC: ACE 5, C18, 5 μ m, 7.75 x 150 mm, 20-30 % B in 30 min, 2.8 mL/min.

HPLC: t_R = 15.47 min, 15-30 % B in 20 min, 0.42 mL/min, ACE 3, C18, 3 μ m, 3 x 150 mm, Reinheit: > 99 %.

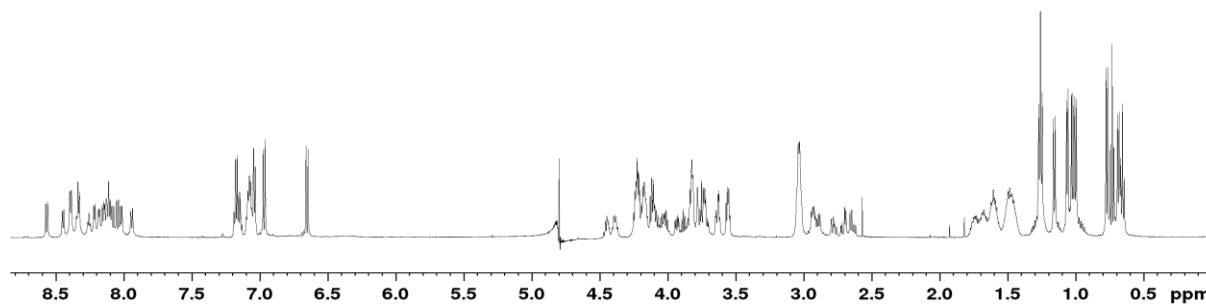
HR-MS (ESI): für C₈₃H₁₃₅N₂₇O₂₇H₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 972.0083, gef.: 972.0097.

Synthese des Peptids **P21** - PKA(RbS²¹)⁵⁻²²



Das Peptid **P21** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 285 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.6)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

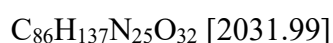
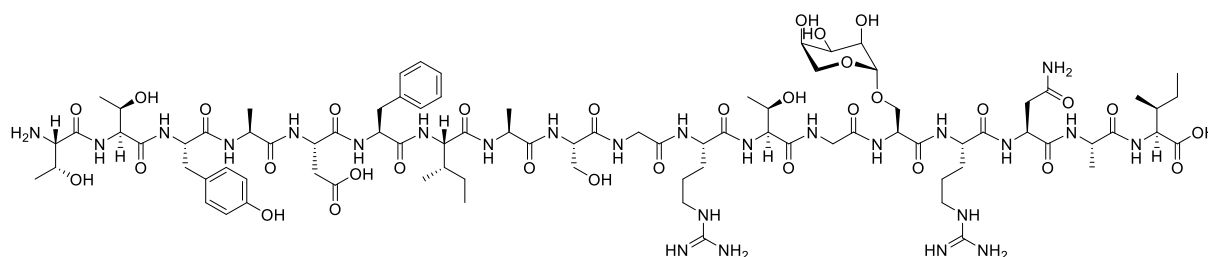
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|--|--|
| 5 | Thr | n.n. | 3.89 | 3.75 | H γ | 1.00 |
| 6 | Thr | 8.57 | 4.23 | 4.01 | H γ | 1.03 |
| 7 | Tyr | 8.45 | 4.38 | 2.90, 2.78 | 2,6-H 3,5-H | 6.97 6.65 |
| 8 | Ala | 8.22 | 4.04 | 1.16 | | |
| 9 | Asp | 8.11 | 4.46 | 2.71, 2.64 | | |
| 10 | Phe | 8.02 | 4.40 | 2.95, 2.92 | 2,4,6-H 3,5-H | 7.17 7.04 |
| 11 | Ile | 7.94 | 3.85 | 1.60 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.69 1.23, 0.97 0.66 |
| 12 | Ala | 8.18 | 4.09 | 1.27 | | |
| 13 | Ser | 8.14 | 4.23 | 3.76, 3.71 | | |
| 14 | Gly | 8.26 | 3.83 | | | |
| 15 | Arg | 8.12 | 4.24 | 1.69, 1.60 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.04 7.08 |
| 16 | Thr | 8.08 | 4.21 | 4.11 | H γ | 1.06 |
| 17 | Gly | 8.34 | 3.83 | | | |
| 18 | Arg | 8.16 | 4.17 | 1.69, 1.60 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.04 7.08 |
| 19 | Arg | 8.39 | 4.17 | 1.69, 1.60 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.04 7.08 |
| 20 | Ala | 8.33 | 4.18 | 1.25 | | |
| 21 | RbS | 8.39 | 4.44 | 3.93, 3.63 | 1-CH 2-CH 3-CH 4-CH 5-CH ₂ | 4.66 3.56 3.79 3.73 3.64, 3.56 |
| 22 | Ile | 8.05 | 4.13 | 1.75 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.77 1.30, 1.04 0.73 |

SemiSemipräp-HPLC: ACE 5, C18, 5 μ m, 7.75 x 150 mm, 20-30 % B in 30 min, 2.8 mL/min.

HPLC: t_R = 8.92 min, 20-30 % B in 20 min, 0.42 mL/min, ACE 3, C18, 3 μ m, 3 x 150 mm, Reinheit: 95 %.

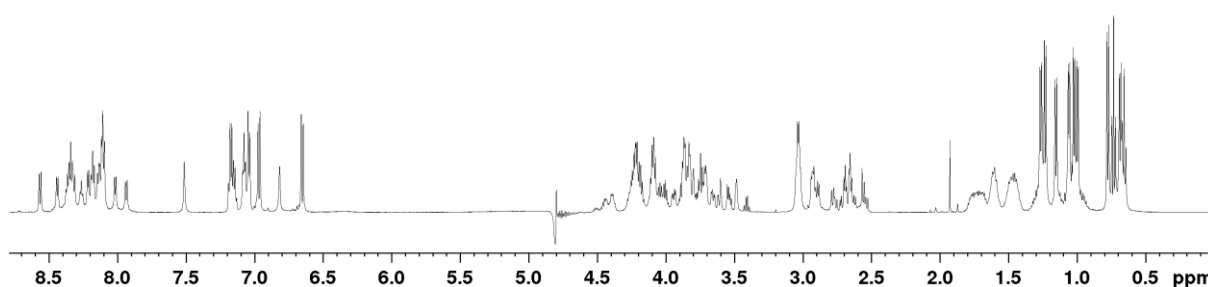
HR-MS (ESI): für C₈₈H₁₄₃N₂₇O₃₁H₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 1038.0294, gef.: 1038.0305.

Synthese des Peptids P28 - PKI(RbS¹⁸)⁵⁻²²



Das Peptid **P28** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 285 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.6)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

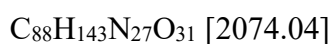
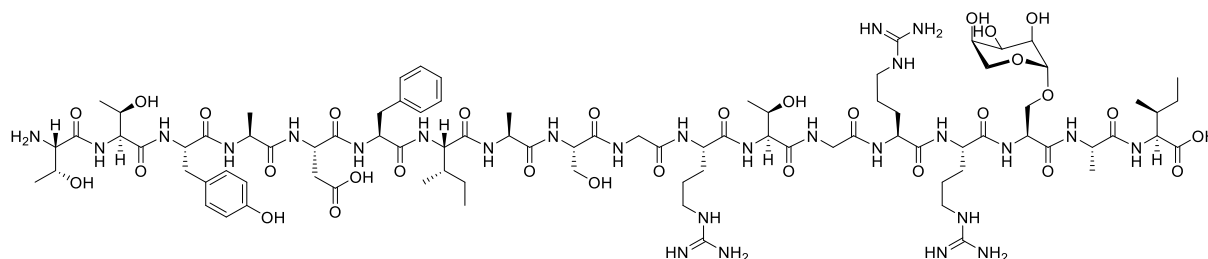
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|--|--|
| 5 | Thr | n.n. | 3.88 | 3.75 | H γ | 1.00 |
| 6 | Thr | 8.57 | 4.22 | 4.00 | H γ | 1.02 |
| 7 | Tyr | 8.44 | 4.38 | 2.90, 2.77 | 2,6-H 3,5-H | 6.97 6.65 |
| 8 | Ala | 8.22 | 4.04 | 1.16 | | |
| 9 | Asp | 8.11 | 4.46 | 2.71, 2.64 | | |
| 10 | Phe | 8.02 | 4.41 | 2.95, 2.92 | 2,4,6-H 3,5-H | 7.17 7.05 |
| 11 | Ile | 7.94 | 3.85 | 1.61 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.69 1.26, 0.96 0.66 |
| 12 | Ala | 8.19 | 4.09 | 1.27 | | |
| 13 | Ser | 8.14 | 4.25 | 3.77, 3.72 | | |
| 14 | Gly | 8.26 | 3.83 | | | |
| 15 | Arg | 8.10 | 4.26 | 1.70, 1.61 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.46 3.04 7.08 |
| 16 | Thr | 8.12 | 4.22 | 4.11 | H γ | 1.06 |
| 17 | Gly | 8.37 | 3.87 | | | |
| 18 | RbS | 8.35 | 4.44 | 3.94, 3.66 | 1-CH 2-CH 3-CH 4-CH 5-CH ₂ | 4.63 3.49 3.80 3.70 3.61, 3.56 |
| 19 | Arg | 8.32 | 4.20 | 1.70, 1.61 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.46 3.04 7.08 |
| 20 | Asn | 8.34 | 4.51 | 2.67, 2.55 | NH ₂ | 7.51, 6.82 |
| 21 | Ala | 8.18 | 4.17 | 1.23 | | |
| 22 | Ile | 8.10 | 4.10 | 1.77 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.78 1.31, 1.07 0.73 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 15-35 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 11.21 min, 15-35 % B in 20 min, 0.60 mL/min, *ACE 3, C18*, 150 x 3 mm,
Reinheit: 98 %.

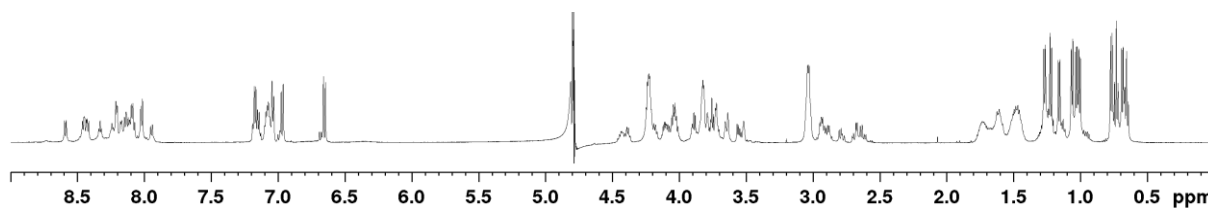
HR-MS (ESI): für C₈₆H₁₃₇N₂₅O₃₂H₃³⁺ [M+3H]³⁺, ber.: 678.6727, gef.: 678.6703.

Synthese des Peptids **P30** - PKI(RbS²⁰)⁵⁻²²



Das Peptid **P30** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 285 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

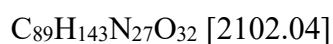
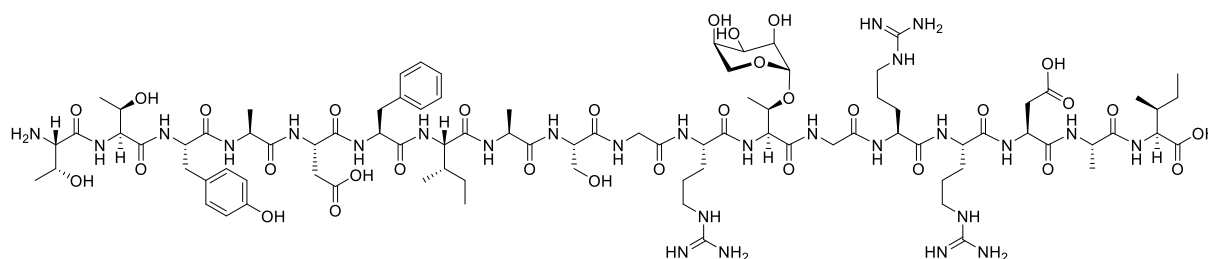
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|--|--|
| 5 | Thr | n.n. | 3.89 | 3.76 | H γ | 1.01 |
| 6 | Thr | 8.59 | 4.13 | 4.17 | H γ | 1.03 |
| 7 | Tyr | 8.46 | 4.37 | 2.90, 2.79 | 2,6-H 3,5-H | 6.97 6.65 |
| 8 | Ala | 8.21 | 4.03 | 1.16 | | |
| 9 | Asp | 8.09 | 4.45 | 2.69, 2.63 | | |
| 10 | Phe | 8.01 | 4.40 | 2.96, 2.92 | 2,4,6-H 3,5-H | 7.16 7.04 |
| 11 | Ile | 7.95 | 3.84 | 1.61 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.54 1.22, 0.97 0.66 |
| 12 | Ala | 8.18 | 4.08 | 1.27 | | |
| 13 | Ser | 8.12 | 4.27 | 3.76, 3.71 | | |
| 14 | Gly | 8.24 | 3.82 | | | |
| 15 | Arg | 8.05 | 4.23 | 1.72, 1.63 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 2.89 7.08 |
| 16 | Thr | 8.08 | 4.21 | 4.11 | H γ | 1.06 |
| 17 | Gly | 8.33 | 3.82 | | | |
| 18 | Arg | 8.14 | 4.23 | 1.71, 1.63 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.04 7.08 |
| 19 | Arg | 8.36 | 4.19 | 1.71, 1.63 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.03 7.08 |
| 20 | RbS | 8.42 | 4.41 | 3.90, 3.64 | 1-CH 2-CH 3-CH 4-CH 5-CH ₂ | 4.64 3.52 3.79 3.65 3.72, 3.55 |
| 21 | Ala | 8.20 | 4.24 | 1.22 | | |
| 22 | Ile | 8.03 | 4.05 | 1.74 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.77 1.30, 1.05 0.73 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 12-35 % B in 30 min, 15 mL/min.

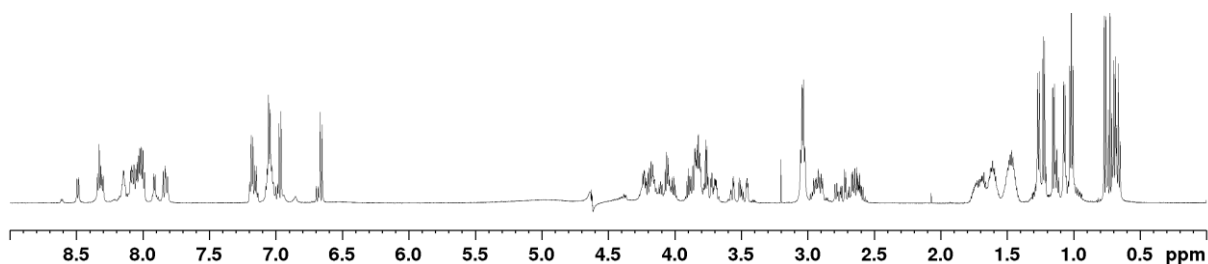
HPLC: t_R = 6.24 min, 12-40 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

HR-MS (ESI): für C₈₈H₁₄₃N₂₇O₃₁H₃³⁺ [M+3H]³⁺, ber.: 692.6899, gef.: 692.6897.

Synthese des Peptids P26 - PKI(RbT¹⁶)⁵⁻²²



Das Peptid **P26** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/D₂O 9:1))

Experimenteller Teil

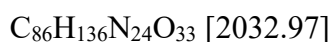
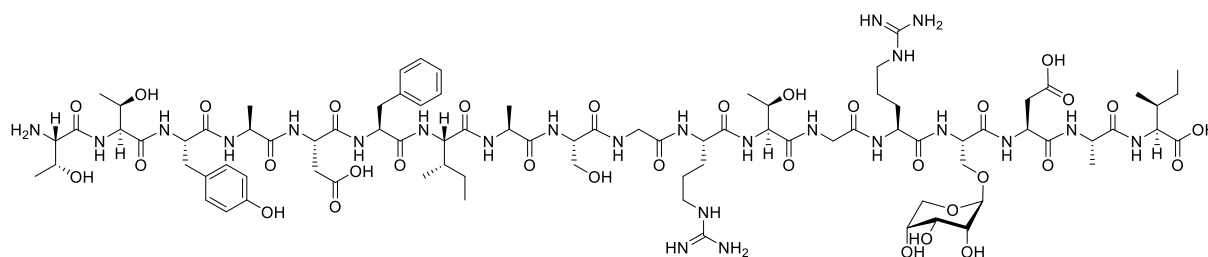
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 5 | Thr | n.n. | 3.90 | 3.76 | H γ | 1.01 |
| 6 | Thr | 8.49 | 4.23 | 4.01 | H γ | 1.02 |
| 7 | Tyr | 8.30 | 4.39 | 2.90, 2.77 | 2,6-H | 6.97 |
| | | | | | 3,5-H | 6.66 |
| 8 | Ala | 8.09 | 4.05 | 1.15 | | |
| 9 | Asp | 7.99 | 4.45 | 2.68, 2.60 | | |
| 10 | Phe | 7.91 | 4.40 | 2.96, 2.92 | 2,4,6-H | 7.18 |
| | | | | | 3,5-H | 7.04 |
| 11 | Ile | 7.82 | 3.86 | 1.61 | H γ -CH ₃ | 0.69 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.23, 0.96 |
| | | | | | H δ | 0.66 |
| 12 | Ala | 8.07 | 4.10 | 1.26 | | |
| 13 | Ser | 8.02 | 4.24 | 3.77, 3.71 | | |
| 14 | Gly | 8.14 | 3.82 | | | |
| 15 | Arg | 8.00 | 4.24, 4.15 | 1.69, 1.61 | H γ | 1.46 |
| | | | | | H δ | 3.03 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.06 |
| 16 | RbT | 8.00 | 4.37 | 4.16 | H γ | 1.07 |
| | | | | | 1-CH | 4.69 |
| | | | | | 2-CH | 3.45 |
| | | | | | 3-CH | 3.85 |
| | | | | | 4-CH | 3.59 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.57, 3.50 |
| 17 | Gly | 8.15 | 3.82 | | | |
| 18 | Arg | 8.06 | 4.24, 4.15 | 1.69, 1.61 | H γ | 1.47 |
| | | | | | H δ | 3.04 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.06 |
| 19 | Arg | 8.34 | 4.24, 4.15 | 1.69, 1.61 | H γ | 1.47 |
| | | | | | H δ | 3.04 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.06 |
| 20 | Asp | 8.32 | 4.48 | 2.73, 2.62 | | |
| 21 | Ala | 8.03 | 4.20 | 1.22 | | |
| 22 | Ile | 7.84 | 4.06 | 1.76 | H γ -CH ₃ | 0.76 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.29, 1.04 |
| | | | | | H δ | 0.72 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 15-35 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 6.07 min, 15-35 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

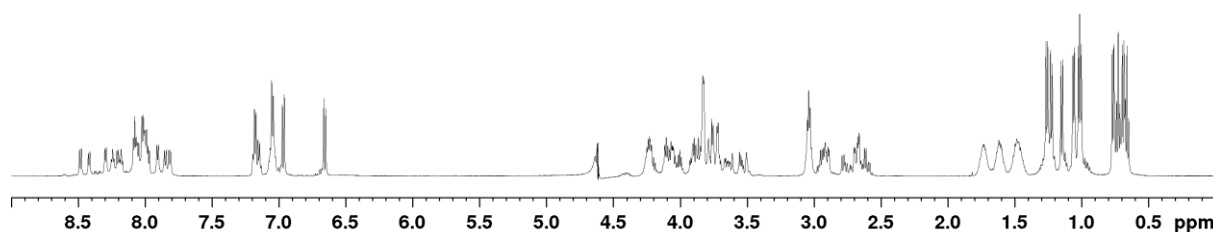
HR-MS (ESI): für C₈₉H₁₄₃N₂₇O₃₂H₃³⁺ [M+3H]³⁺, ber.: 702.0223, gef.: 702.0213.

Synthese des Peptids P29 - PKI(RbS¹⁹)⁵⁻²²



Das Peptid **P29** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

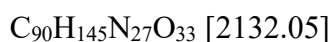
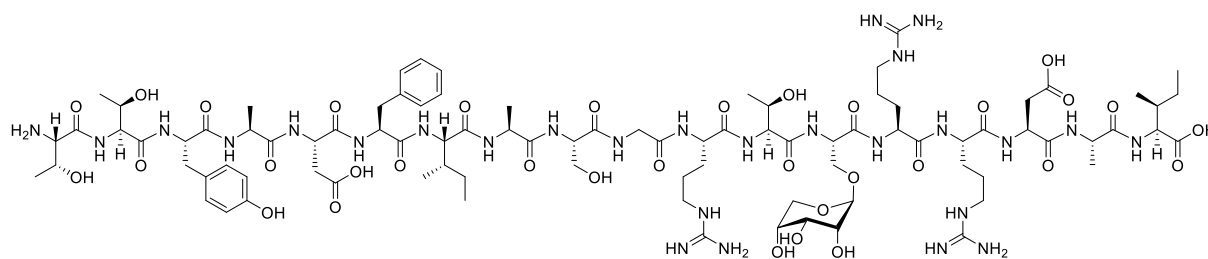
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 5 | Thr | n.n. | 3.89 | 3.75 | H γ | 1.01 |
| 6 | Thr | 8.48 | 4.24 | 4.00 | H γ | 1.02 |
| 7 | Tyr | 8.30 | 4.38 | 2.90, 2.77 | 2,6-H | 6.97 |
| | | | | | 3,5-H | 6.66 |
| 8 | Ala | 8.08 | 4.05 | 1.15 | | |
| 9 | Asp | 7.99 | 4.53 | 2.71, 2.65 | | |
| 10 | Phe | 7.91 | 4.40 | 2.96, 2.90 | 2,6-H | 7.18 |
| | | | | | 3,5-H | 7.05 |
| | | | | | 4-H | 7.15 |
| 11 | Ile | 7.82 | 3.86 | 1.62 | H γ -CH ₃ | 0.69 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.25, 0.96 |
| | | | | | H δ | 0.66 |
| 12 | Ala | 8.07 | 4.12 | 1.26 | | |
| 13 | Ser | 8.01 | 4.25 | 3.76, 3.71 | | |
| 14 | Gly | 8.18 | 3.83 | | | |
| 15 | Arg | 8.02 | 4.26 | 1.73, 1.60 | H γ | 1.46 |
| | | | | | H δ | 3.05 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.05 |
| 16 | Thr | 8.00 | 4.22 | 4.10 | H γ | 1.06 |
| 17 | Gly | 8.24 | 3.83 | | | |
| 18 | Arg | 8.05 | 4.26 | 1.73, 1.60 | H γ | 1.46 |
| | | | | | H δ | 3.05 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.05 |
| 19 | RbS | 8.42 | 4.43 | 3.91, 3.65 | 1-CH | 4.63 |
| | | | | | 2-CH | 3.50 |
| | | | | | 3-CH | 3.79 |
| | | | | | 4-CH | 3.72 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.62, 3.54 |
| 20 | Asp | 8.20 | 4.45 | 2.68, 2.60 | | |
| 21 | Ala | 7.97 | 4.20 | 1.23 | | |
| 22 | Ile | 7.85 | 4.07 | 1.74 | H γ -CH ₃ | 0.77 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.29, 1.04 |
| | | | | | H δ | 0.73 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 15-40 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 5.08 min, 15-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

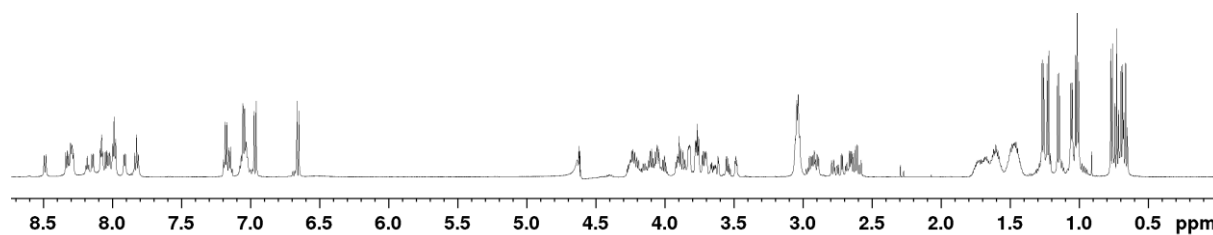
HR-MS (ESI): für C₈₆H₁₃₆N₂₄O₃₃H₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 1017.9952, gef.: 1017.9938.

Synthese des Peptids **P27** - PKI(RbS¹⁷)⁵⁻²²



Das Peptid **P27** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

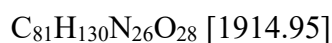
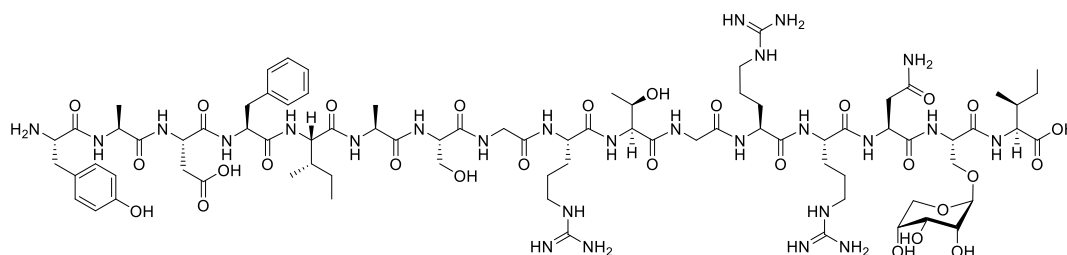
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|--|--|
| 5 | Thr | n.n. | 3.90 | 3.77 | H γ | 1.01 |
| 6 | Thr | 8.49 | 4.24 | 4.00 | H γ | 1.02 |
| 7 | Tyr | 8.30 | 4.39 | 2.91, 2.77 | 2,6-H 3,5-H | 6.97 6.66 |
| 8 | Ala | 8.09 | 4.06 | 1.15 | | |
| 9 | Asp | 8.33 | 4.51 | 2.73, 2.63 | | |
| 10 | Phe | 7.91 | 4.42 | 2.96, 2.91 | 2,6-H 3,5-H 4-H | 7.19 7.05 7.15 |
| 11 | Ile | 7.82 | 3.87 | 1.63 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.69 1.26, 0.97 0.66 |
| 12 | Ala | 8.08 | 4.10 | 1.26 | | |
| 13 | Ser | 8.03 | 4.25 | 3.76, 3.71 | | |
| 14 | Gly | 8.18 | 3.83 | | | |
| 15 | Arg | 7.98 | 4.27 | 1.73, 1.61 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.04 7.05 |
| 16 | Thr | 7.99 | 4.26 | 4.11 | H γ | 1.05 |
| 17 | RbS | 8.31 | 4.47 | 3.91, 3.66 | 1-CH 2-CH 3-CH 4-CH 5-CH ₂ | 4.62 3.48 3.78 3.70 3.62, 3.54 |
| 18 | Arg | 8.15 | 4.18 | 1.68, 1.61 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.03 7.05 |
| 19 | Arg | 8.29 | 4.15 | 1.75, 1.68 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.48 3.04 7.05 |
| 20 | Asp | 8.00 | 4.45 | 2.67, 2.60 | | |
| 21 | Ala | 8.05 | 4.21 | 1.22 | | |
| 22 | Ile | 7.83 | 4.05 | 1.75 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.76 1.29, 1.05 0.73 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 15-30 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 6.01 min, 15-35 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

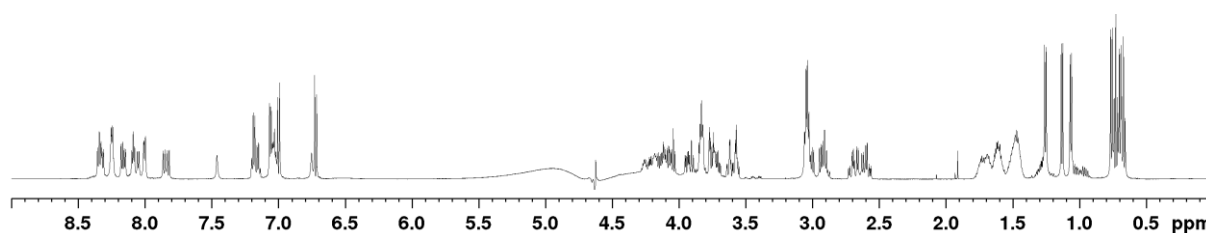
HR-MS (ESI): für C₉₀H₁₄₅N₂₇O₃₃H₃³⁺ [M+3H]³⁺, ber.: 712.0248, gef.: 712.0240.

Synthese des Peptids P69 - PKI(RbS²¹)⁷⁻²²



Das Peptid **P69** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

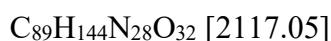
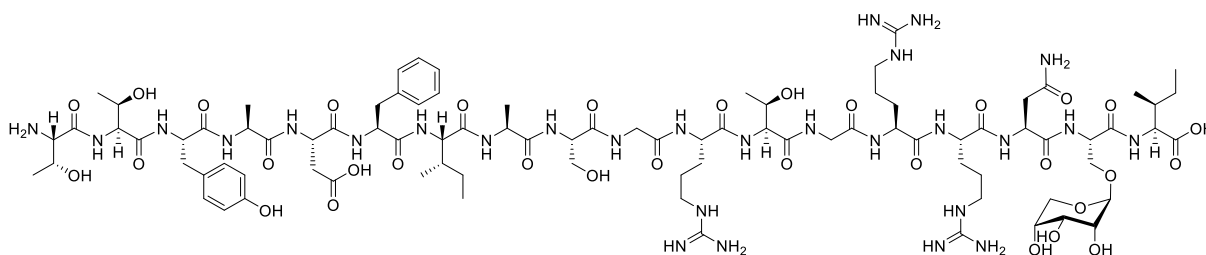
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 7 | Tyr | n.n. | 4.04 | 3.01, 2.93 | 2,6-H | 7.00 |
| | | | | | 3,5-H | 6.72 |
| 8 | Ala | 8.33 | 4.15 | 1.13 | | |
| 9 | Asp | 8.17 | 4.46 | 2.67, 2.58 | | |
| 10 | Phe | 8.00 | 4.45 | 2.92, 2.89 | 2,6-H | 7.19 |
| | | | | | 3,5-H | 7.06 |
| | | | | | 4-H | 7.15 |
| 11 | Ile | 7.82 | 4.07 | 1.63 | H γ -CH ₃ | 0.69 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.25, 0.95 |
| | | | | | H δ | 0.67 |
| 12 | Ala | 8.15 | 4.12 | 1.25 | | |
| 13 | Ser | 8.08 | 4.25 | 3.76, 3.70 | | |
| 14 | Gly | 8.25 | 3.84 | | | |
| 15 | Arg | 8.09 | 4.27 | 1.74, 1.63 | H γ | 1.48 |
| | | | | | H δ | 3.04 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.03 |
| 16 | Thr | 8.01 | 4.22 | 4.11 | H γ | 1.06 |
| 17 | Gly | 8.26 | 3.84 | | | |
| 18 | Arg | 8.05 | 4.19 | 1.69, 1.64 | H γ | 1.48 |
| | | | | | H δ | 3.04 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.03 |
| 19 | Arg | 8.35 | 4.18 | 1.79, 1.69 | H γ | 1.48 |
| | | | | | H δ | 3.04 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.03 |
| 20 | Asn | 8.35 | 4.57 | 2.71, 2.61 | γ NH ₂ | 7.46, 6.75 |
| 21 | RbS | 8.24 | 4.43 | 3.94, 3.61 | 1-CH | 4.67 |
| | | | | | 2-CH | 3.57 |
| | | | | | 3-CH | 3.77 |
| | | | | | 4-CH | 3.73 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.63, 3.56 |
| 22 | Ile | 7.86 | 3.90 | 1.75 | H γ -CH ₃ | 0.76 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.30, 1.02 |
| | | | | | H δ | 0.72 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 15-30 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 5.62 min, 15-30 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, (Reinheit: 98 %).

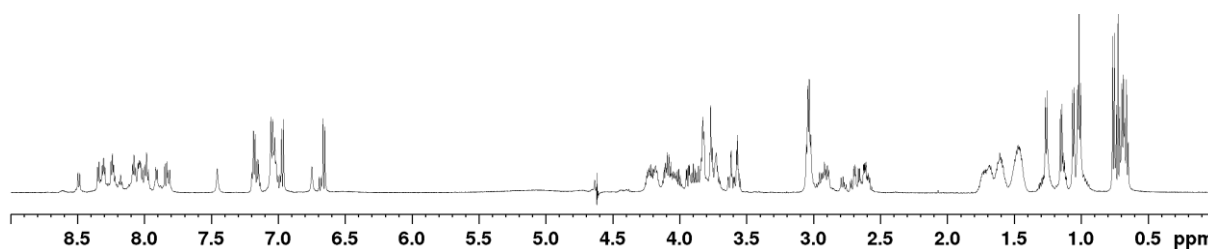
HR-MS (ESI): für C₈₁H₁₃₀N₂₆O₂₈H₃³⁺ [M+3H]³⁺, ber.: 639.3255, gef.: 639.3249.

Synthese des Peptids **P31** - PKI(RbS²¹)⁵⁻²²



Das Peptid **P31** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 5 | Thr | n.n. | 3.90 | 3.76 | H γ | 1.01 |
| 6 | Thr | 8.49 | 4.22 | 4.01 | H γ | 1.02 |
| 7 | Tyr | 8.30 | 4.38 | 2.91, 2.78 | 2,6-H | 6.97 |
| | | | | | 3,5-H | 6.66 |
| 8 | Ala | 8.08 | 4.04 | 1.15 | | |
| 9 | Asp | 7.99 | 4.43 | 2.67, 2.60 | | |
| 10 | Phe | 7.91 | 4.41 | 2.96, 2.91 | 2,6-H | 7.19 |
| | | | | | 3,5-H | 7.05 |
| | | | | | 4-H | 7.15 |
| 11 | Ile | 7.82 | 3.86 | 1.63 | H γ -CH ₃ | 0.69 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.25, 0.97 |
| | | | | | H δ | 0.66 |
| 12 | Ala | 8.07 | 4.09 | 1.26 | | |
| 13 | Ser | 8.02 | 4.26 | 3.76, 3.71 | | |
| 14 | Gly | 8.18 | 3.83 | | | |
| 15 | Arg | 8.05 | 4.23 | 1.69, 1.59 | H γ | 1.48 |
| | | | | | H δ | 3.04 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.02 |
| 16 | Thr | 7.98 | 4.20 | 4.11 | H γ | 1.06 |
| 17 | Gly | 8.23 | 3.83 | | | |
| 18 | Arg | 8.03 | 4.23 | 1.69, 1.59 | H γ | 1.48 |
| | | | | | H δ | 3.04 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.02 |
| 19 | Arg | 8.31 | 4.18 | 1.69, 1.59 | H γ | 1.48 |
| | | | | | H δ | 3.04 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.03 |
| 20 | Asn | 8.35 | 4.57 | 2.71, 2.64 | γ NH ₂ | 7.46, 6.75 |
| 21 | RbS | 8.25 | 4.45 | 3.94, 3.60 | 1-CH | 4.66 |
| | | | | | 2-CH | 3.57 |
| | | | | | 3-CH | 3.77 |
| | | | | | 4-CH | 3.73 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.74, 3.56 |
| 22 | Ile | 7.84 | 4.08 | 1.75 | H γ -CH ₃ | 0.76 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.31, 1.02 |
| | | | | | H δ | 0.72 |

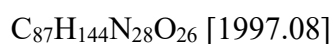
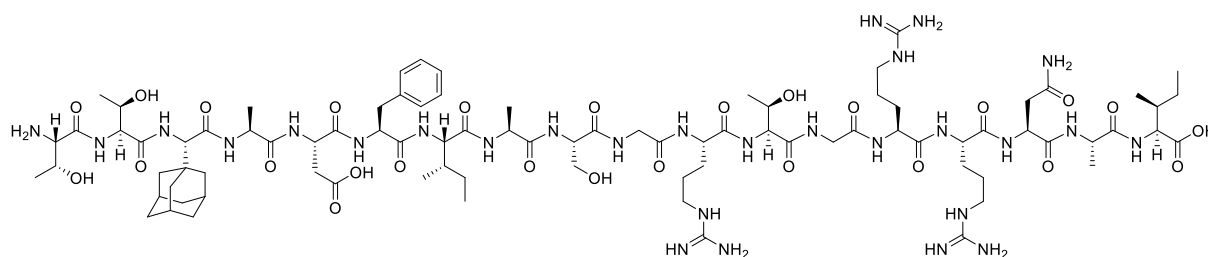
Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 15-30 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 5.32 min, 15-40 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 99 %.

HR-MS (ESI): für C₈₉H₁₄₄N₂₈O₃₂H₃³⁺ [M+3H]³⁺, ber.: 707.0249, gef.: 707.0246.

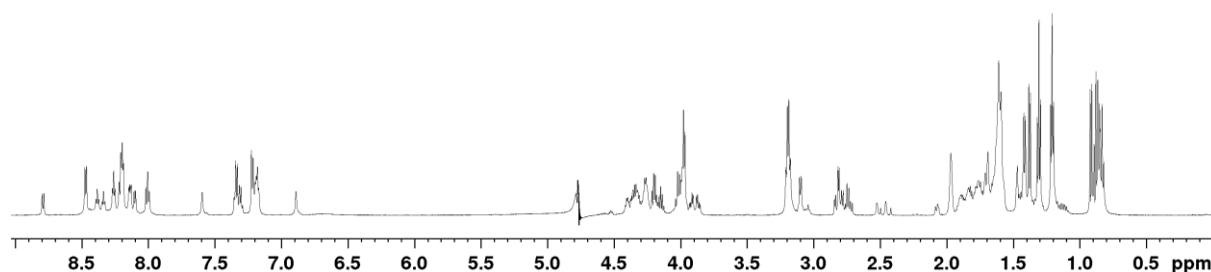
6.7 Synthese der PKI-Peptide mit Adamantyl-Aminosäuren

Synthese des Peptids P35 - PKI(SC1⁷)⁵⁻²²



Das Peptid **P35** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

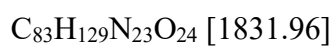
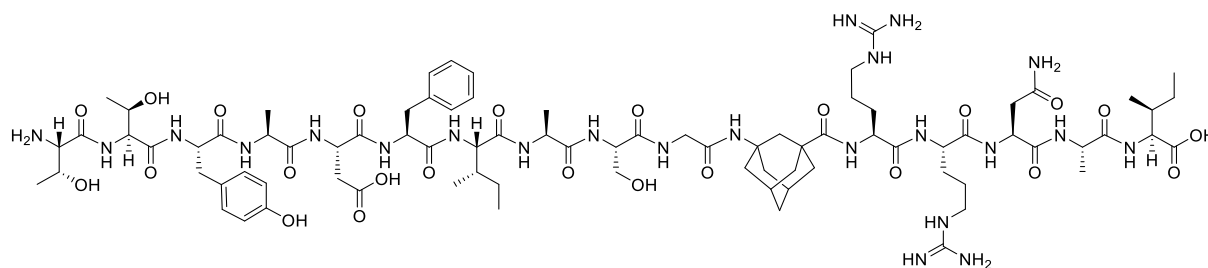
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 5 | Thr | n.n. | 4.15 | 3.96 | H γ | 1.20 |
| 6 | Thr | 8.79 | 4.52 | 4.18 | H γ | 1.21 |
| 7 | SC1 | 8.14 | 4.00 | | H γ | 1.61 |
| | | | | | H δ | 1.97 |
| | | | | | H ϵ | 1.70 |
| 8 | Ala | 8.27 | 4.27 | 1.31 | | |
| 9 | Asp | 8.20 | 4.61 | 2.80, 2.77 | | |
| 10 | Phe | 8.10 | 4.57 | 3.10 | 2,6-H | 7.34 |
| | | | | | 3,5-H | 7.21 |
| | | | | | 4-H | 7.31 |
| 11 | Ile | 8.00 | 4.02 | 1.83 | H γ -CH ₃ | 0.86 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.43, 1.13 |
| | | | | | H δ | 0.83 |
| 12 | Ala | 8.25 | 4.28 | 1.41 | | |
| 13 | Ser | 8.19 | 4.40 | 3.92, 3.86 | | |
| 14 | Gly | 8.34 | 3.98 | | | |
| 15 | Arg | 8.19 | 4.34 | 1.77, 1.70 | H γ | 1.60 |
| | | | | | H δ | 3.19 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.18 |
| 16 | Thr | 8.13 | 4.37 | 4.25 | H γ | 1.30 |
| 17 | Gly | 8.38 | 3.98 | | | |
| 18 | Arg | 8.46 | 4.32 | 1.77, 1.70 | H γ | 1.60 |
| | | | | | H δ | 3.19 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.18 |
| 19 | Arg | 8.46 | 4.32 | 1.77, 1.70 | H γ | 1.60 |
| | | | | | H δ | 3.19 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.18 |
| 20 | Asn | 8.48 | 4.67 | 2.83, 2.73 | γ NH ₂ | 7.60, 6.89 |
| 21 | Ala | 8.21 | 4.35 | 1.38 | | |
| 22 | Ile | 8.01 | 4.20 | 1.90 | H γ -CH ₃ | 0.91 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.46, 1.18 |
| | | | | | H δ | 0.88 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 15-50 % B in 30 min, 15 mL/min.

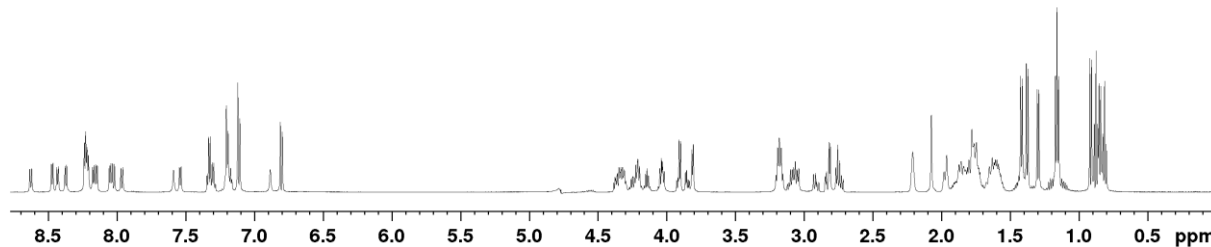
HPLC: t_R = 6.92 min, 15-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 93 %.

HR-MS (ESI): für C₈₇H₁₄₄N₂₈O₂₆H₃³⁺ [M+3H]³⁺, ber.: 667.0353, gef.: 667.0348.

Synthèse des Peptids P37 - PKI(BB1¹⁵⁻¹⁷)⁵⁻²²



Das Peptid **P37** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3)/D₂O 9:1))

Experimenteller Teil

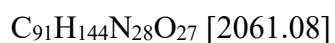
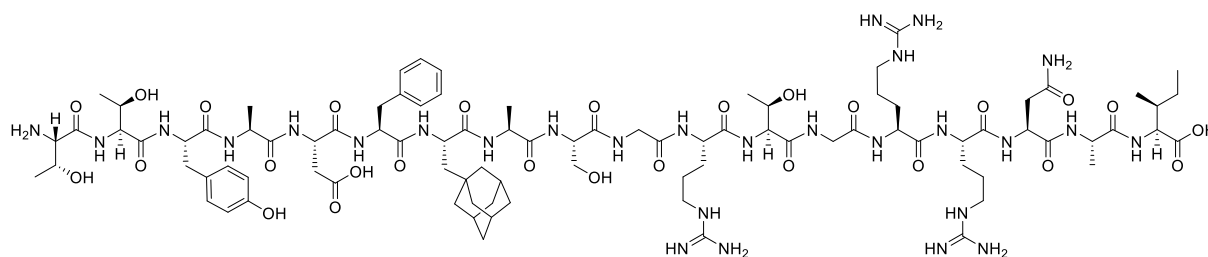
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|--|--|----------------------------|
| 5 | Thr | n.n. | 4.04 | 3.90 | H γ | 1.15 |
| 6 | Thr | 8.63 | 4.37 | 4.14 | H γ | 1.16 |
| 7 | Tyr | 8.43 | 4.54 | 3.06, 2.91 | 2,6-H 3,5-H | 7.11 6.80 |
| 8 | Ala | 8.22 | 4.21 | 1.30 | | |
| 9 | Asp | 8.15 | 4.61 | 2.82, 2.75 | | |
| 10 | Phe | 8.05 | 4.57 | 3.10 | 2,6-H 3,5-H 4-H | 7.33 7.20 7.30 |
| 11 | Ile | 7.97 | 4.03 | 1.75 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.85 1.39, 1.12 0.81 |
| 12 | Ala | 8.23 | 4.25 | 1.42 | | |
| 13 | Ser | 8.17 | 4.33 | 3.91, 3.85 | | |
| 14 | Gly | 8.22 | 3.81 | | | |
| 15-17 | BB1 | 7.12 | - | 2.07 (β_1) 1.76 (β_2) | H γ_2 H δ_1 H δ_2 | 2.21 1.64 1.86 |
| 18 | Arg | 7.54 | 4.31 | 1.82, 1.74 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.58 3.17 7.18 |
| 19 | Arg | 8.37 | 4.35 | 1.82, 1.74 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.58 3.17 7.18 |
| 20 | Asn | 8.47 | 4.69 | 2.81, 2.73 | γ NH ₂ | 7.59, 6.89 |
| 21 | Ala | 8.21 | 4.31 | 1.38 | | |
| 22 | Ile | 8.03 | 4.20 | 1.87 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.91 1.45, 1.19 0.87 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 20-40 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 5.57 min, 20-40 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 92 %.

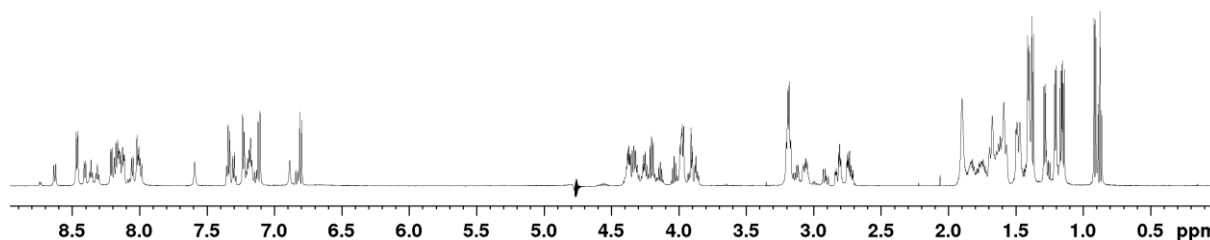
HR-MS (ESI): für C₈₃H₁₂₉N₂₃O₂₄H₃³⁺ [M+3H]³⁺, ber.: 611.9943, gef.: 611.9938.

Synthese des Peptids P33 - PKI(SC2¹¹)⁵⁻²²



Das Peptid **P33** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

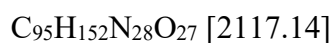
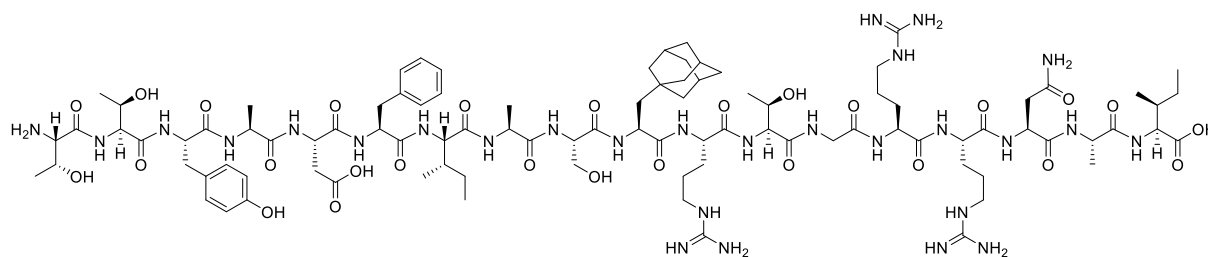
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|--|----------------------------|
| 5 | Thr | n.n. | 4.03 | 3.91 | H γ | 1.15 |
| 6 | Thr | 8.63 | 4.39 | 4.14 | H γ | 1.16 |
| 7 | Tyr | 8.41 | 4.54 | 3.05, 2.91 | 2,6-H 3,5-H | 7.11 6.80 |
| 8 | Ala | 8.17 | 4.21 | 1.28 | | |
| 9 | Asp | 8.15 | 4.60 | 2.82, 2.72 | | |
| 10 | Phe | 8.05 | 4.56 | 3.13, 3.06 | 2,6-H 3,5-H 4-H | 7.34 7.23 7.30 |
| 11 | SC2 | 7.99 | 4.30 | 1.49 | H δ H ϵ H ζ | 1.60 1.90 1.68, 1.58 |
| 12 | Ala | 8.21 | 4.24 | 1.40 | | |
| 13 | Ser | 8.13 | 4.38 | 3.91, 3.87 | | |
| 14 | Gly | 8.31 | 3.98 | | | |
| 15 | Arg | 8.16 | 4.31 | 1.77, 1.66 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.59 3.18 7.19 |
| 16 | Thr | 8.12 | 4.37 | 4.27 | H γ | 1.20 |
| 17 | Gly | 8.36 | 3.98 | | | |
| 18 | Arg | 8.18 | 4.33 | 1.77, 1.66 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.59 3.18 7.19 |
| 19 | Arg | 8.47 | 4.40 | 1.82, 1.73 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.59 3.18 7.19 |
| 20 | Asn | 8.46 | 4.65 | 2.81, 2.74 | γ NH ₂ | 7.59, 6.89 |
| 21 | Ala | 8.21 | 4.34 | 1.37 | | |
| 22 | Ile | 8.01 | 4.19 | 1.89 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.91 1.45, 1.26 0.87 |

Semipräp-HPLC: ACE 5, SuperC18, 150 x 10 mm, 15-50 % B in 20 min, 7.0 mL/min.

HPLC: t_R = 6.54 min, 15-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, ACE UltraCore 2.5, SuperC18, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

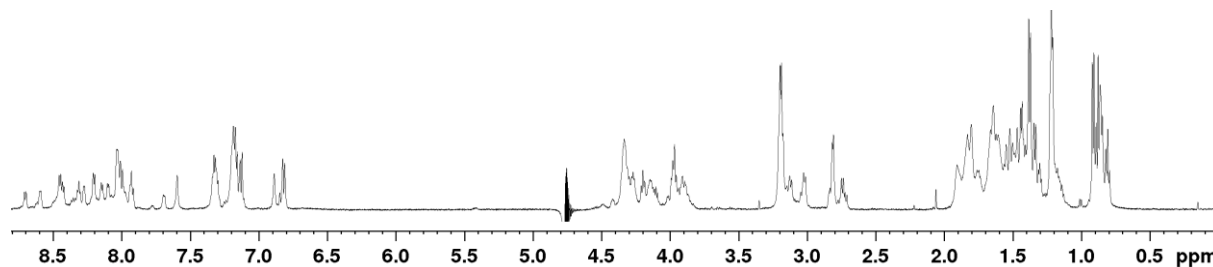
HR-MS (ESI): für C₉₁H₁₄₄N₂₈O₂₇H₃³⁺ [M+3H]³⁺, ber.: 688.3667, gef.: 688.3666.

Synthese des Peptids **P34** - PKI(SC2¹³)⁵⁻²²



Das Peptid **P34** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

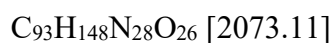
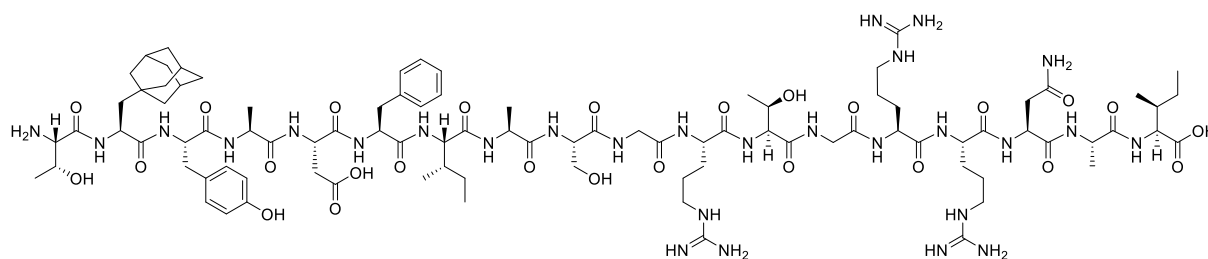
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 5 | Thr | n.n. | 4.11 | 3.89 | H γ | 1.21 |
| 6 | Thr | 8.70 | 4.42 | 4.28 | H γ | 1.22 |
| 7 | Tyr | 8.59 | 4.53 | 3.03 | 2,6-H | 7.13 |
| | | | | | 3,5-H | 6.82 |
| 8 | Ala | 8.20 | 4.26 | 1.38 | | |
| 9 | Asp | 7.99 | 4.58 | 2.81, 2.74 | | |
| 10 | Phe | 8.10 | 4.49 | 3.14 | 2,6-H | 7.33 |
| | | | | | 3,5-H | 7.21 |
| | | | | | 4-H | 7.32 |
| 11 | Ile | 8.01 | 3.93 | 1.86 | H γ -CH ₃ | 0.85 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.43, 1.16 |
| | | | | | H δ | 0.81 |
| 12 | Ala | 8.04 | 4.16 | 1.44 | | |
| 13 | Ser | 8.03 | 4.32 | 4.00, 3.90 | | |
| 14 | SC2 | 8.02 | 4.56 | 1.50 | H δ | 1.62 |
| | | | | | H ϵ | 1.90 |
| | | | | | H ζ | 1.67, 1.58 |
| 15 | Arg | 8.03 | 4.34 | 1.82, 1.75 | H γ | 1.60 |
| | | | | | H δ | 3.20 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.20 |
| 16 | Thr | 7.93 | 4.33 | 4.26 | H γ | 1.23 |
| 17 | Gly | 8.31 | 3.98 | | | |
| 18 | Arg | 8.15 | 4.34 | 1.82, 1.75 | H γ | 1.60 |
| | | | | | H δ | 3.20 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.20 |
| 19 | Arg | 8.43 | 4.31 | 1.82, 1.75 | H γ | 1.60 |
| | | | | | H δ | 3.20 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.20 |
| 20 | Asn | 8.45 | 4.60 | 2.83, 2.73 | γ NH ₂ | 7.60, 6.89 |
| 21 | Ala | 8.28 | 4.11 | 1.34 | | |
| 22 | Ile | 8.01 | 4.20 | 1.90 | H γ -CH ₃ | 0.91 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.50, 1.21 |
| | | | | | H δ | 0.88 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 15-70 % B in 30 min, 15 mL/min.

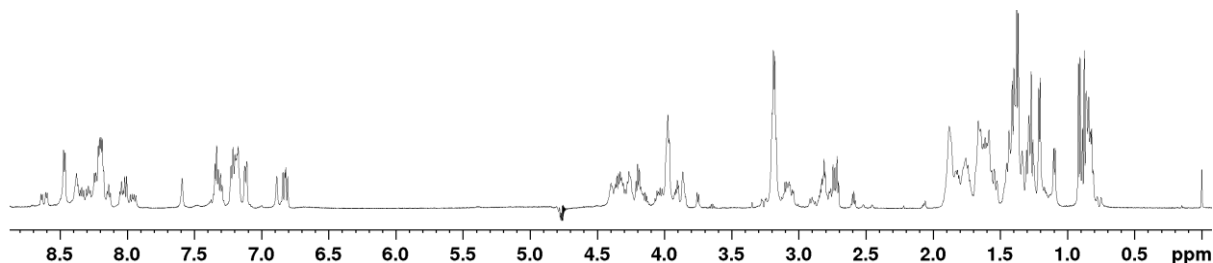
HPLC: $t_R = 7.20$ min, 15-70 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 82 %.

HR-MS (ESI): für C₉₅H₁₅₂N₂₈O₂₇H₃³⁺ [M+3H]³⁺, ber.: 707.0543, gef.: 707.0535.

Synthese des Peptids P36 - PKI(SC2⁶)⁵⁻²²



Das Peptid **P36** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspalllösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3)/D₂O 9:1))

Experimenteller Teil

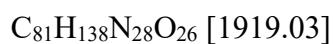
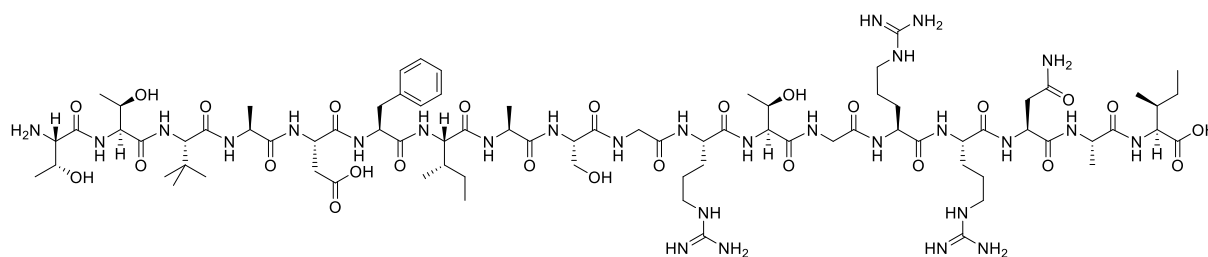
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 5 | Thr | n.n. | 4.00 | 3.75 | H γ | 1.10 |
| 6 | SC2 | 8.33 | 4.62 | 1.55 | H δ | 1.61 |
| | | | | | H ϵ | 1.89 |
| | | | | | H ζ | 1.67, 1.58 |
| 7 | Tyr | 8.24 | 4.51 | 3.07, 2.90 | 2,6-H | 7.12 |
| | | | | | 3,5-H | 6.82 |
| 8 | Ala | 8.60 | 4.21 | 1.37 | | |
| 9 | Asp | 8.30 | 4.60 | 2.81, 2.73 | | |
| 10 | Phe | 8.04 | 4.56 | 3.08 | 2,6-H | 7.34 |
| | | | | | 3,5-H | 7.22 |
| | | | | | 4-H | 7.31 |
| 11 | Ile | 7.94 | 4.05 | 1.77 | H γ -CH ₃ | 0.85 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.42, 1.13 |
| | | | | | H δ | 0.82 |
| 12 | Ala | 8.28 | 4.29 | 1.42 | | |
| 13 | Ser | 8.20 | 4.40 | 3.92, 3.86 | | |
| 14 | Gly | 8.38 | 3.98 | | | |
| 15 | Arg | 8.21 | 4.32 | 1.82, 1.74 | H γ | 1.60 |
| | | | | | H δ | 3.19 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.19 |
| 16 | Thr | 8.14 | 4.37 | 4.26 | H γ | 1.21 |
| 17 | Gly | 8.39 | 3.98 | | | |
| 18 | Arg | 8.21 | 4.32 | 1.82, 1.74 | H γ | 1.60 |
| | | | | | H δ | 3.19 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.19 |
| 19 | Arg | 8.47 | 4.34 | 1.82, 1.74 | H γ | 1.60 |
| | | | | | H δ | 3.19 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.19 |
| 20 | Asn | 8.48 | 4.63 | 2.84, 2.72 | γ NH ₂ | 7.59, 6.89 |
| 21 | Ala | 8.19 | 4.16 | 1.28 | | |
| 22 | Ile | 8.01 | 4.20 | 1.88 | H γ -CH ₃ | 0.91 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.46, 1.17 |
| | | | | | H δ | 0.88 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 15-70 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 9.07 min, 15-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 89 %.

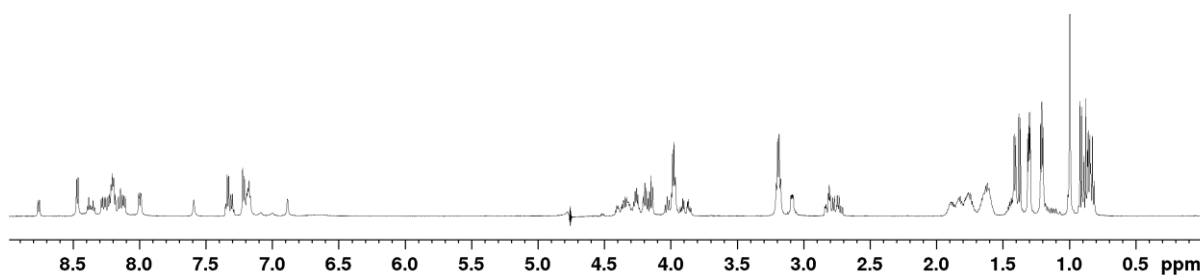
HR-MS (ESI): für C₉₅H₁₅₂N₂₈O₂₇H₃³⁺ [M+3H]³⁺, ber.: 707.0543, gef.: 707.0535.

Synthese des Peptids P70 - PKI(tLeu⁷)⁵⁻²²



Das Peptid **P70** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

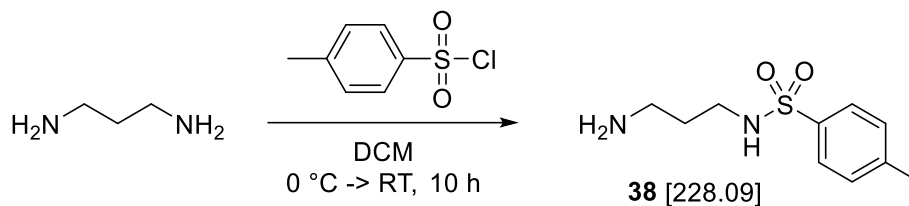
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 5 | Thr | n.n. | 4.16 | 3.97 | H γ | 1.30 |
| 6 | Thr | 8.76 | 4.52 | 4.20 | H γ | 1.20 |
| 7 | tLeu | 8.15 | 4.15 | | H γ | 1.00 |
| 8 | Ala | 8.28 | 4.27 | 1.31 | | |
| 9 | Asp | 8.23 | 4.62 | 2.80, 2.75 | | |
| 10 | Phe | 8.11 | 4.58 | 3.10, 3.07 | 2,6-H | 7.34 |
| | | | | | 3,5-H | 7.22 |
| | | | | | 4-H | 7.30 |
| 11 | Ile | 7.99 | 4.03 | 1.75 | H γ -CH ₃ | 0.85 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.46, 1.11 |
| | | | | | H δ | 0.83 |
| 12 | Ala | 8.26 | 4.25 | 1.41 | | |
| 13 | Ser | 8.20 | 4.39 | 3.92, 3.86 | | |
| 14 | Gly | 8.35 | 3.99 | | | |
| 15 | Arg | 8.19 | 4.39 | 1.83, 1.76 | H γ | 1.63 |
| | | | | | H δ | 3.19 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.18 |
| 16 | Thr | 8.14 | 4.36 | 4.26 | H γ | 1.21 |
| 17 | Gly | 8.38 | 3.98 | | | |
| 18 | Arg | 8.20 | 4.33 | 1.83, 1.76 | H γ | 1.63 |
| | | | | | H δ | 3.19 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.18 |
| 19 | Arg | 8.47 | 4.31 | 1.83, 1.76 | H γ | 1.63 |
| | | | | | H δ | 3.19 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.18 |
| 20 | Asn | 8.46 | 4.66 | 2.82, 2.73 | γ NH ₂ | 7.59, 6.89 |
| 21 | Ala | 8.21 | 4.41 | 1.37 | | |
| 22 | Ile | 8.00 | 4.19 | 1.89 | H γ -CH ₃ | 0.91 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.43, 1.17 |
| | | | | | H δ | 0.88 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 15-50 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 5.58 min, 15-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 93 %.

HR-MS (ESI): für C₈₁H₁₃₈N₂₈O₂₆H₃³⁺ [M+3H]³⁺, ber.: 640.6852, gef.: 640.6906.

6.8 Synthese der Fasudil-Derivate

N-(3-Aminopropyl)-4-methylbenzylsulfonamid (**38**)

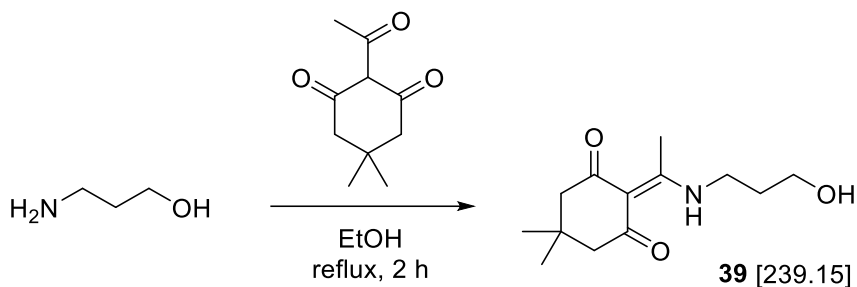
| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [g] | V [ml] |
|---------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|-------|--------|
| Propylendiamin | 74.13 | 0.88 | 10.0 | 52.6 | 3.91 | 4.44 |
| Tosylchlorid | 190.65 | - | 1.00 | 5.26 | 1.00 | - |

1.00 g (5.26 mmol, 1.00 eq) Tosylchlorid wurden bei 0 °C in 5.30 mL DCM gelöst und in einem weiteren Kolben 4.44 mL (52.6 mmol, 10.0 eq) Propylendiamin mit 17.4 mL versetzt. Anschließend wurde die Propylendiamin-Lösung schnell zur Tosylchlorid-Lösung gegeben und über Nacht auf RT erwärmt. Der Feststoff wurde abfiltriert und das Filtrat unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde mit Eiswasser versetzt und 2 h bei 4 °C gelagert. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Eiswasser gewaschen und gefriergetrocknet. Es konnten 623 mg (2.73 mmol, 52 %) eines weißen Feststoffs **38** erhalten werden.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 7.66 (d, $^3J_{2,6-\text{CH}_{\text{aromat.}}/3,5\text{H}} = 8.2$ Hz, 2H, 2,6-CH_{aromat.}), 7.39 (d, $^3J_{3,5-\text{CH}_{\text{aromat.}}/2,6\text{H}} = 8.2$ Hz, 2H, 3,5-CH_{aromat.}), 2.75 (t, $^3J_{1-\text{CH}_2/2\text{H}} = 7.0$ Hz, 2H, 1-CH₂), 2.49 (t, $^3J_{3-\text{CH}_2/2\text{H}} = 7.0$ Hz, 2H, 3-CH₂), 2.38 (s, 3H, Ts-CH₃), 1.41 (quin., $^3J_{2-\text{CH}_2/1\text{H},3\text{H}} = 7.0$ Hz, 2H, 2-CH₂).

HR-MS (ESI): für C₁₀H₁₆N₂O₂SH⁺ [M+H]⁺, ber.: 229.1005, gef.: 229.1005.

DC: R_f = 0.58 (DCM/MeOH 8:1).

2-(1-((3-Hydroxypropyl)amino)ethyliden)-5,5-dimethylcyclohexan-1,3-dion (39)

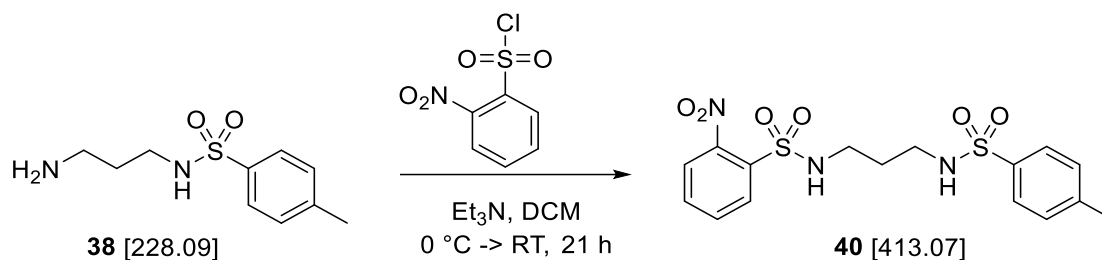
| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [g] | V [ml] |
|---------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|-------|--------|
| 3-Aminopropanol | 75.11 | 0.99 | 1.00 | 6.70 | 0.50 | 0.51 |
| 2-Acetyldimedon | 182.22 | - | 1.00 | 6.70 | 1.21 | - |

In 30 mL EtOH wurden 1.21 g (6.70 mmol, 1.00 eq) 2-Acetyldimedon gelöst und mit 0.50 g (6.70 mmol, 1.00 eq) 3-Aminopropanol versetzt. Es wurde 2 h unter Sieden erhitzt und das Reaktionsgemisch unter vermindertem Druck getrocknet. Anschließend wurde viermal mit DCM koevaporiert, um 1.47 g (6.15 mmol, 92 %) eines gelben Feststoffs **39** als Produkt zu erhalten.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 13.25 (t, $^3J_{\text{NH/1H}}$ = 4.8 Hz, 1H, NH), 4.64 (t, $^3J_{\text{OH/3H}}$ = 4.8 Hz, 1H, OH), 3.49, 3.47 (2x t, $^3J_{\text{1-CH,3-CH/2H}}$ = 6.8 Hz, 4H, 1-CH₂, 3-CH₂), 2.48 (s, 3H, CH₃-Dde), 2.27 (s, 4H, 2x CH₂-Dde_{Ring}), 1.72 (quin., $^3J_{\text{2-CH/1H,3H}}$ = 6.6 Hz, 2H, 2-CH₂), 0.94 (s, 6H, 2x CH₃-Dde_{Ring}).

HR-MS (ESI): für C₁₃H₂₁NO₃Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 262.1414, gef.: 262.1413.

DC: R_f = 0.56 (DCM/MeOH 8:1).

N-(3-((4-Methylphenyl)sulfonamido)propyl)-2-nitrobenzenesulfonamid (40)

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [mg] | V [ml] |
|--|-----------|-----------------------------|------|----------|--------|--------|
| N-(3-Aminopropyl)-4-methylbenzylsulfonamid | 228.09 | - | 1.00 | 0.44 | 100 | - |
| Nosylchlorid | 220.96 | - | 1.00 | 0.44 | 102 | - |
| Triethylamin | 101.19 | 0.73 | 1.00 | 0.44 | 44.4 | 0.06 |

100 mg (0.44 mmol, 1.00 eq) des Sulfonamids **38**, sowie 60.8 μL (0.44 mmol, 1.00 eq) Triethylamin wurden in 4.00 mL DCM bei 0 °C gelöst. In einem weiteren Kolben wurden 102 mg (0.44 mmol, 1.00 eq) Nosylchlorid in 1.00 mL DCM gelöst und zur gekühlten Sulfonamid-Reaktionslösung getropft. Es wurde 21 h bei RT gerührt und anschließend dreimal mit dest. Wasser gewaschen, die org. Phase über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. 146 mg (0.35 mmol, 80 %) eines gelben Öls **40** konnten erhalten werden.

¹H NMR: 600 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 8.05 (t, $^3J_{\text{NH/1H}} = 5.8$ Hz, 1H, Ns-NH), 7.97-7.95 (m, 2H, Ns-2,6- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 7.86-7.85 (m, 2H, Ns-3,5- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 7.63 (d, $^3J_{2,6-\text{CH}_{\text{aromat.}}/3,5\text{H}} = 8.2$ Hz, 2H, Ts-2,6- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 7.49 (t, $^3J_{\text{NH/1H}} = 5.8$ Hz, 1H, Ts-NH), 7.38 (d, $^3J_{3,5-\text{CH}_{\text{aromat.}}/2,6\text{H}} = 8.2$ Hz, 2H, Ts-3,5- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 2.87 (quin., $^3J_{3-\text{CH}_2/2\text{H}} = 6.7$ Hz, 2H, 3- CH_2), 2.69 (quin., $^3J_{1-\text{CH}_2/2\text{H}} = 6.7$ Hz, 2H, 1- CH_2), 2.38 (s, 3H, Ts- CH_3), 1.54 (quin., $^3J_{2-\text{CH}_2/1\text{H},3\text{H}} = 7.1$ Hz, 2H, 2- CH_2).

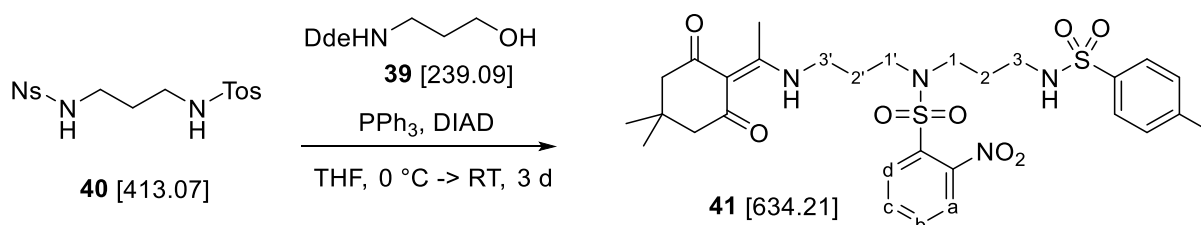
¹³C NMR: 150 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 147.7, 142.6, 137.5, 137.4 (C_q), 134.0, 132.6 (Ns-3,5- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 129.6 (Ts-3,5- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 129.4, 124.4 (Ns-2,6-

CH_{aromat.}), 126.5 (Ts-2,6-CH_{aromat.}), 40.3 (3-CH₂), 40.0 (1-CH₂), 29.4 (2-CH₂), 20.9 (Ts-CH₃).

HR-MS (ESI): für $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 436.0607, gef.: 436.0607.

DC: $R_f = 0.83$ (DCM/MeOH 8:1).

***N*-(3-((1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)ethyl)amino)propyl)-*N*-(3-((4-methylphenyl)sulfonamido)propyl)-2-nitrobenzylsulfonamid (41)**



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [mg] | V [ml] |
|----------------------------|-----------|--------------------------------|------|-------------|-----------|-----------|
| Gesch. Diamin 40 | 413.07 | - | 1.50 | 0.12 | 50.0 | - |
| Dde-Aminopropanol | 239.09 | - | 1.00 | 0.08 | 19.1 | - |
| Diisopropylazodicarboxylat | 202.21 | 1.03 | 1.70 | 0.14 | 27.5 | 0.03 |
| Triphenylphosphin | 262.29 | - | 1.70 | 0.14 | 35.7 | |

In einem ausgeheizten Kolben im Eisbad wurden 35.7 mg (0.14 mmol, 1.70 eq) Triphenylphosphin in 2.00 mL THF (abs.) gelöst und mit 26.7 μ L (0.14 mmol, 1.70 eq) DIAD für 30 min gerührt. Anschließend wurden 50.0 mg (0.12 mmol, 1.50 eq) des geschützten Diamins **40** zugegeben und weitere 20 min gerührt. In einem zweiten Kolben wurden unter Schutzgasatmosphäre 19.1 mg (0.08 mmol, 1.00 eq) Dde-Aminopropanol **39** in 1.00 mL THF gelöst und langsam zur gekühlten Reaktionslösung getropft. Unter DC-Kontrolle wurde 3 h bei RT

Experimenteller Teil

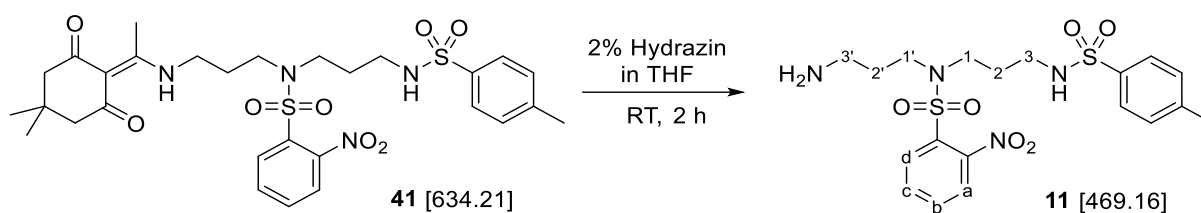
gerührt, bevor das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (EtOAc/Pentan 5:1) aufgereinigt wurde. Es konnte ein quantitativer Umsatz in Form eines weißen Schaums **41** erzielt werden.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 13.25 (t, $^3J_{NH/1H}$ = 4.9 Hz, 1H, Dde-NH), 7.98 (dd, $^3J_{d-CH/cH}$ = 4.2 Hz, 4J = 1.3 Hz, 1H, Ns-d-CH_{aromat.}), 7.97 (dd, $^3J_{a-CH/bH}$ = 4.2 Hz, 4J = 1.3 Hz, 1H, Ns-a-CH_{aromat.}), 7.88 (ddd, $^3J_{b-CH/aH,cH}$ = 7.7 Hz, 4J = 1.3 Hz, 1H, Ns-b-CH_{aromat.}), 7.82 (ddd, $^3J_{c-CH/bH,dH}$ = 7.7 Hz, 4J = 1.3 Hz, 1H, Ns-c-CH_{aromat.}), 7.64-7.61 (m, 2H, Ts-2,6-CH_{aromat.}), 7.54-7.53 (m, 1H, Ts-NH), 7.38 (d, $^3J_{3,5-CH_{aromat.}/2,6H}$ = 8.0 Hz, 2H, Ts-3,5-CH_{aromat.}), 3.35 (quin., $^3J_{3'-CH/2'H}$ = 6.9 Hz, 2H, 3'-CH₂), 3.27 (t, $^3J_{1'-CH/2'H}$ = 7.2 Hz, 2H, 1'-CH₂), 3.25 (t, $^3J_{1-CH/2H}$ = 7.2 Hz, 2H, 1-CH₂), 2.68 (quin., $^3J_{3-CH/2H}$ = 6.7 Hz, 2H, 3-CH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃-Dde), 2.37 (s, 3H, Ts-CH₃), 2.28 (s, 4H, 2x CH₂-Dde_{Ring}), 1.75 (quin., $^3J_{2'-CH/1'H,3'H}$ = 7.2 Hz, 2H, 2'-CH₂), 1.61 (quin., $^3J_{2-CH/1H,3H}$ = 7.2 Hz, 2H, 2-CH₂), 0.94 (s, 6H, 2x CH₃-Dde_{Ring}).

HR-MS (ESI): für C₂₉H₃₈N₄O₈S₂H⁺ [M+H]⁺, ber.: 635.2204, gef.: 635.2213.

DC: R_f = 0.24 (EtOAc/Pentan 5:1).

***N*-(3-Aminopropyl)-*N*-(3-((4-methylphenyl)sulfonamido)propyl)-2-nitrobenzylsulfonamid (**11**)**

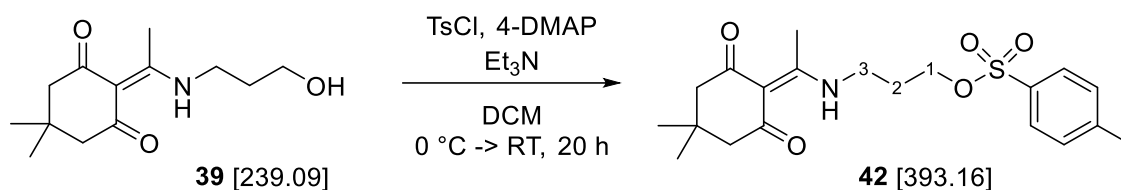


21.0 mg (0.03 mmol, 1.00 eq) des geschützten Triamins **41** wurden für 2 h in 2.00 mL 2 %iger Hydrazin Lösung in THF bei RT gerührt. Der Umsatz wurde mittels DC kontrolliert. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in DCM aufgenommen und in wenig kaltem Et₂O ausgefällt. Der Niederschlag wurde zentrifugiert und mit Et₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand mit Wasser/MeCN aufgenommen und die Lösung gefriergetrocknet. Es konnten 13.2 mg (27.6 µmol, 84 %) eines gelblichen Feststoffs **11** erhalten werden.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 7.96 (dt, ³J_{d,a-CH/c,bH} = 7.7 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 2H, Ns-a,d-CH_{aromat.}), 7.88 (ddd, ³J_{b-CH/aH,cH} = 7.7 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, Ns-b-CH_{aromat.}), 7.82 (ddd, ³J_{c-CH/bH,dH} = 7.7 Hz, ⁴J = 1.4 Hz, 1H, Ns-c-CH_{aromat.}), 7.64 (d, ³J_{2,6-CH_{aromat.}/3,5H} = 8.2 Hz, 2H, Ts-2,6-CH_{aromat.}), 7.57-7.54 (m, 1H, Ts-NH), 7.38 (d, ³J_{3,5-CH_{aromat.}/2,6H} = 8.2 Hz, 2H, Ts-3,5-CH_{aromat.}), 3.24 (t, ³J_{1'-CH/2'H} = 7.3 Hz, 2H, 1'-CH₂), 3.21 (t, ³J_{1-CH/2H} = 7.2 Hz, 2H, 1-CH₂), 2.67 (quin., ³J_{3-CH/2H} = 7.2 Hz, 2H, 3-CH₂), 2.52-2.50 (m, 2H, 3'-CH₂), 2.38 (s, 3H, Ts-CH₃), 1.60 (quin., ³J_{2-CH/1'H,3'H} = 7.2 Hz, 2H, 2-CH₂), 1.52 (quin., ³J_{2'-CH/1'H,3'H} = 7.2 Hz, 2H, 2'-CH₂).

¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 147.5, 142.6, 137.3 (C_q), 134.4, 132.4 (Ns-3,5-CH_{aromat.}), 129.6 (Ts-3,5-CH_{aromat.}), 129.6, 124.3 (Ns-2,6-CH_{aromat.}), 126.5 (Ts-2,6-CH_{aromat.}), 45.6 (1'-CH₂), 45.2 (1-CH₂), 40.0 (3-CH₂), 39.6 (3'-CH₂), 31.0 (2'-CH₂), 28.1 (2-CH₂), 20.9 (Ts-CH₃).

DC: R_f = 0.29 (EtOAc).

3-((1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl)amino)propyl-4-methylbenzylsulfonat (42)


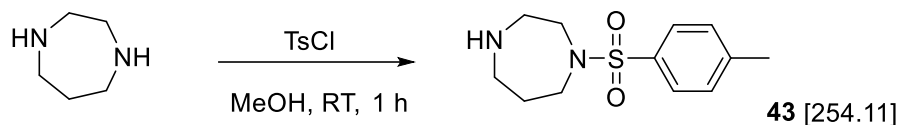
| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [mg] | V [ml] |
|-----------------------------|-----------|------------------------|------|----------|--------|--------|
| Dde-Aminopropanol 39 | 239.09 | - | 1.00 | 0.42 | 100 | - |
| Tosylchlorid | 190.65 | - | 1.20 | 0.50 | 95.0 | - |
| Triethylamin | 101.19 | 0.73 | 1.20 | 0.50 | 50.8 | 0.07 |
| 4-DMAP | 122.17 | - | kat. | - | - | - |

100 mg (0.42 mmol, 1.00 eq) Dde-Aminopropanol **39** wurden in 5.00 mL DCM gelöst und mit 69.6 µL (0.50 mmol, 1.20 eq) Et₃N versetzt. In einem weiteren Kolben wurden 95.0 mg (0.50 mmol, 1.20 eq) TsCl und eine Spatelspitze 4-DMAP in 3.00 mL DCM gelöst und für 10 min mit Argon gespült. Anschließend wurde die TsCl-Lösung bei 0 °C zur Aminopropanol-Lösung getropft und über 20 h auf RT erwärmt. Die Reaktionslösung wurde unter vermindertem Druck vom Lösungsmittel befreit und säulenchromatographisch aufgereinigt (EtOAc/Pentan 2:1). Es konnten 110 mg (0.28 mmol, 67 %) eines gelblichen Feststoffs **42** erhalten werden.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 13.18 (t, ³J_{NH/1H} = 5.3 Hz, 1H, NH), 7.78 (d, ³J_{2,6-CH_{aromat.}/3,5H} = 8.3 Hz, 2H, 2,6-CH_{aromat.}), 7.47 (³J_{3,5-CH_{aromat.}/3,5H} = 8.4 Hz, 2H, 3,5-CH_{aromat.}), 4.09 (t, ³J_{3H/2H} = 6.2 Hz, 2H, 3-CH₂), 3.40 (q, ³J_{1H/2H} = 6.4 Hz, 2H, 1-CH₂), 2.41 (s, 3H, Dde-CH₃), 2.39 (s, 3H, Tos-CH₃), 2.26 (s, 4H, 2x DdeRing-CH₂), 1.90 (quin., ³J_{2H/1H,3H} = 6.4 Hz, 2H, 2-CH₂), 0.94 (s, 6H, 2x DdeRing-CH₃).

HR-MS (ESI): für C₂₀H₂₇NO₅SN⁺ [M+Na]⁺, ber.: 416.1513, gef.: 416.1505.

DC: R_f = 0.42 (EtOAc/Pentan 2:1).

1-Tosyl-1,4-diazepan (**43**)

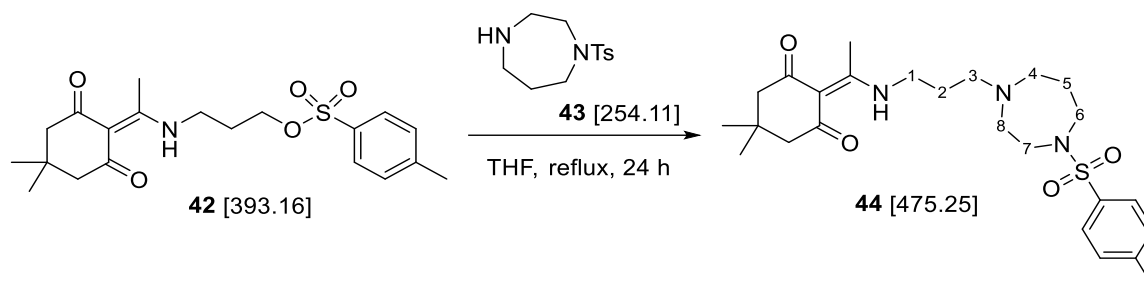
| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | eq | n [mmol] | m [mg] |
|---------------------|-----------|------|----------|--------|
| Homopiperazin | 100.10 | 1.00 | 1.25 | 125 |
| Tosylchlorid | 190.65 | 1.00 | 1.25 | 238 |

In einem Kolben wurden 125 mg (1.25 mmol, 1.00 eq) Homopiperazin in 25.0 mL MeOH vorgelegt. Über einen Tropftrichter wurde eine Lösung aus 238 mg (1.25 mmol, 1.00 eq) TsCl in 25.0 mL MeOH über 90 min zugetropft und anschließend wurde weitere 60 min gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 25.0 mL 0.1 M HCl versetzt und unter vermindertem Druck eingengt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat mit 2 M NH₃-Lösung auf pH 9 gebracht. Es wurde sechsmal mit DCM gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung lieferten 121 mg (0.48 mmol, 38 %) eines weißen Feststoffs **43**.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 7.67 (d, $^3J_{2,6-CH_{aromat.}/3,5H}$ = 8.3 Hz, 2H, Ts-2,6-CH_{aromat.}), 7.42 (d, $^3J_{3,5-CH_{aromat.}/2,6H}$ = 8.2 Hz, 2H, Ts-3,5-CH_{aromat.}), 3.27-3.23 (m, 4H, 1-/5-CH₂), 2.90-2.87 (m, 2H, 2-CH₂), 2.86-2.82 (m, 2H, 3-CH₂), 2.40 (s, 3H, Tos-CH₃), 1.74 (quin, $^3J_{4H/3,5H}$ = 6.0 Hz, 2H, 4-CH₂).

DC: R_f = 0.20 (DCM/MeOH 4:1).

5,5-Dimethyl-2-(1-((3-(4-tosyl-1,4-diazepan-1-yl)propyl)amino)ethyliden)cyclohexan-1,3-dion (44)



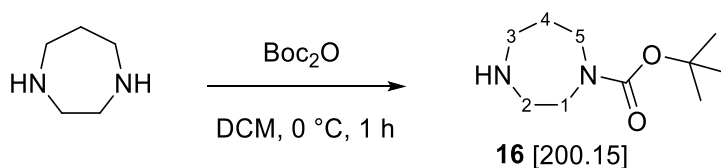
| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [mg] |
|--|-----------|-----------------------------|------|----------|--------|
| 1-Tosyl-Homopiperazin 43 | 254.11 | - | 1.20 | 0.30 | 75.0 |
| Dde-Aminopropyl-4-methylbenzylsulfonat 42 | 393.16 | - | 1.00 | 0.25 | 96.7 |

In 5.00 mL THF (abs.) wurden 75.0 mg (0.30 mmol, 1.20 eq) Ts-Homopiperazin **43** sowie 96.7 mg (0.25 mmol, 1.00 eq) des Dde- und Tosyl-geschützten Aminopropanols **42** gelöst und unter Rückfluss für 24 h gekocht. Es wurde mit Chloroform verdünnt und zweimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Zuletzt wurde über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 20:1). 71.0 mg (0.15 mmol, 60 %) des Produktes konnten als gelbliches Öl **44** erhalten werden.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 13.20 (t, $^3J_{\text{NH/1H}}$ = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.65 (d, $^3J_{2,6\text{-CH}_{\text{aromat.}}/3,5\text{H}}$ = 8.4 Hz, 2H, 2,6-CH_{aromat.}), 7.41 ($^3J_{3,5\text{-CH}_{\text{aromat.}}/3,5\text{H}}$ = 8.6 Hz, 2H, 3,5-CH_{aromat.}), 3.40 (q, $^3J_{1\text{H}/2\text{H}}$ = 6.4 Hz, 2H, 1-CH₂), 3.26-3.23 (m, 4H, 6-/7-CH₂), 2.61-2.59 (m, 2H, 8-CH₂), 2.54 (t, $^3J_{4\text{H}/5\text{H}}$ = 5.6 Hz, 2H, 4-CH₂), 2.45 (t, $^3J_{3\text{H}/2\text{H}}$ = 6.7 Hz, 2H, 3-CH₂), 2.45 (s, 3H, Dde-CH₃), 2.39 (s, 3H, Tos-CH₃), 2.25 (s, 4H, 2x DdeRing-CH₂), 1.71-1.67 (m, 2H, 5-CH₂), 1.66 (quin., $^3J_{2\text{H}/1\text{H},3\text{H}}$ = 6.8 Hz, 2H, 2-CH₂), 0.93 (s, 6H, 2x DdeRing-CH₃).

HR-MS (ESI): für C₂₅H₃₇N₃O₄SH⁺ [M+H]⁺, ber.: 476.2578, gef.: 476.2578.

DC: R_f = 0.71 (DCM/MeOH 4:1).

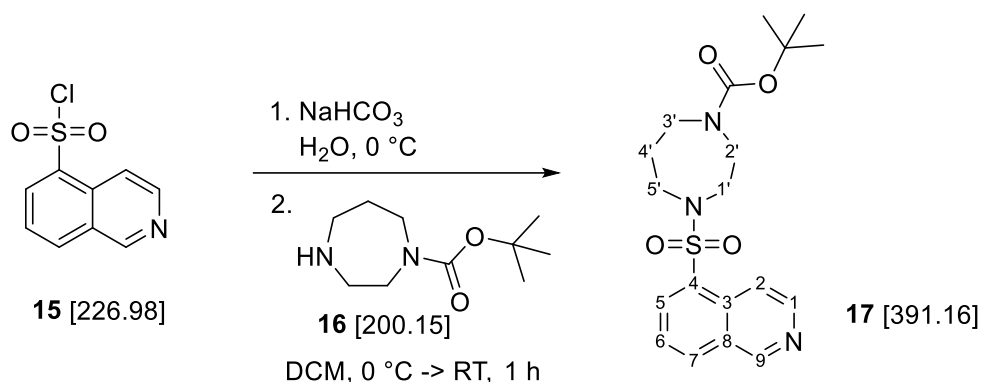
Tert-Butyl-1,4-diazepan-1-carboxylat (16)

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [g] |
|----------------------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|-------|
| Homopiperazin | 100.10 | - | 1.00 | 18.0 | 1.84 |
| Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat | 218.25 | - | 0.50 | 9.00 | 2.00 |

In einem mit Eisbad gekühlten Kolben wurden 1.84 g (18.0 mmol, 1.00 eq) Homopiperazin in 45.0 mL DCM gelöst. Eine weitere Lösung aus 2.00 g (9.00 mmol, 0.50 eq) Boc₂O in 18.0 mL DCM wurde langsam zur Homopiperazin-Lösung getropft und nach vollständiger Zugabe noch eine weitere Stunde bei 0 °C gerührt. Die entstandene Suspension wurde filtriert und aus dem Filtrat unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde mit Wasser aufgenommen, mit ges. K₂CO₃-Lösung versetzt und dreimal mit Et₂O gewaschen. Zuletzt wurde über Na₂SO₄ getrocknet, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt und somit 1.49 g (7.46 mmol, 83 %) einer farblosen Flüssigkeit **16** erhalten.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 3.33 (t, ³*J*_{1H/2H} = 6.2 Hz, 2H, 1-CH₂), 3.26 (t, ³*J*_{5H/4H} = 5.3 Hz, 2H, 5-CH₂), 2.72-2.68 (m, 2H, 2-CH₂), 2.67-2.62 (m, 2H, 3-CH₂), 2.24 (bs, 1H, NH), 1.61 (quin., ³*J*_{4H/3H,5H} = 6.0 Hz, 2H, 4-CH₂), 1.39 (s, 9H, 3x CH₃).

HR-MS (ESI): für C₁₀H₂₀N₂O₂H⁺ [M+H]⁺, ber.: 201.1598, gef.: 201.1600.

Tert-Butyl 4-(isochinolin-5-ylsulfonyl)-1,4-diazepan-1-carboxylat (17)

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | eq | n [mmol] | m [mg] |
|--|-----------|------|----------|--------|
| 5-Isochinolinsulfonylchlorid x HCl 15 | 226.98 | 1.00 | 0.34 | 90.0 |
| NaHCO₃ | 84.01 | 1.00 | 0.34 | 28.7 |
| 1-Boc-Homopiperazin 16 | 200 | 3.00 | 1.03 | 205 |

90.0 mg (0.34 mmol, 1.00 eq) des Sulfonylchlorids **15** wurden in 2.00 mL Wasser unter Eiskühlung suspendiert und mit 28.7 mg (0.34 mmol, 1.00 eq) NaHCO₃ versetzt. Anschließend wurde dreimal mit DCM gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck auf ein Volumen von 2.00 mL eingengt. In einem weiteren Kolben wurden 205 mg (1.03 mmol, 3.00 eq) Boc-Homopiperazin **16** in 2.00 mL DCM gelöst und unter Eiskühlung wurde die Sulfonylchlorid-Lösung hinzuge tropft. Nach 1 h Rühren bei RT wurde zweimal mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 40:1) lieferten 90.0 mg (0.23 mmol, 67 %) eines gelblichen Öls **17**.

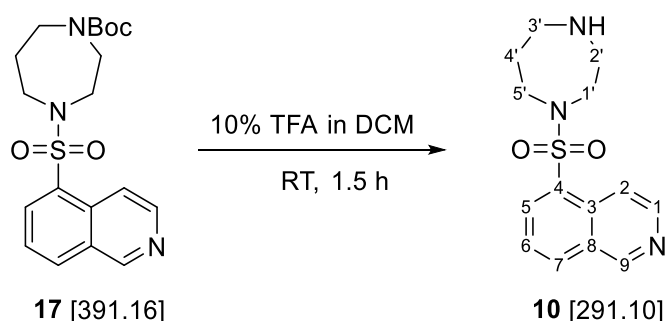
¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 9.49 (s, 1H, 9-CH), 8.70 (d, ³J_{1H/2H} = 6.1 Hz, 1H, 1-CH), 8.46 (d, ³J_{7H/6H} = 8.2 Hz, 1H, 7-CH), 8.34 (d, ³J_{2H/1H} = 6.0 Hz, 1H, 2-CH), 8.32 (d, ³J_{5H/6H} = 7.4 Hz, 1H, 5-CH), 7.86-7.82 (m, 1H, 6-CH), 3.46-3.45 (m, 2H, 1'-CH₂), 3.40-3.35 (m, 4H, 3'-,5'-CH₂), 3.27 (t, ³J_{2'H/1'H} = 5.7 Hz, 2H, 2'-CH₂), 1.75 (quin., ³J_{4'H/3'H,5'H} = 6.2 Hz, 2H, 4'-CH₂), 1.37 (s, 9H, 3x CH₃).

HR-MS (ESI): für $C_{19}H_{25}N_3O_4SH^+$ $[M+H]^+$, ber.: 392.1639, gef.: 392.1644.

DC: $R_f = 0.42$ (DCM/MeOH 10:1).

HPLC: $t_R = 5.33$ min, 30-70 % B in 10 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C18, 3 μm , 150 x 3 mm, Reinheit: 93 %.

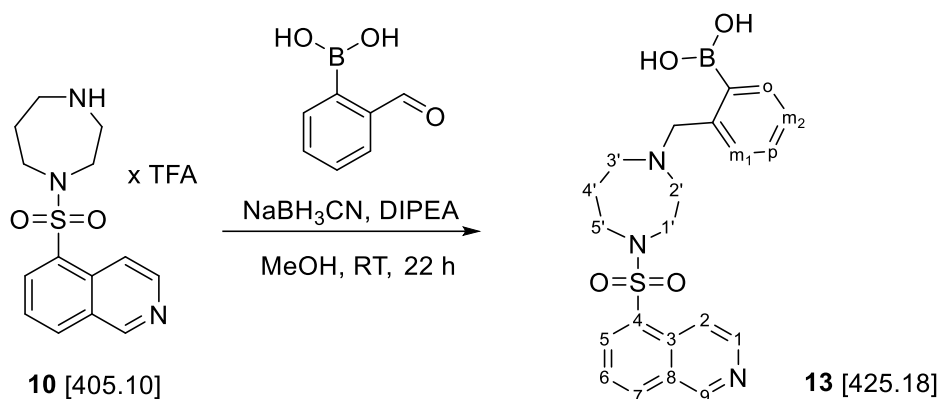
5-((1,4-Diazepan-1-yl)sulfonyl)isochinolin (10)



30 mg (0.08 mmol, 1.00 eq) des Boc-Fasudils **17** wurden mit 3.00 mL 10 %iger TFA in DCM versetzt und 1.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung unter vermindertem Druck getrocknet, der Rückstand in DCM aufgenommen und zweimal mit ges. $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Zuletzt wurde über $MgSO_4$ getrocknet, *in vacuo* eingeeengt und somit 21.0 mg (0.07 mmol, 94 %) eines klaren Öls **10** erhalten.

1H NMR: 500 MHz, 300 K, $DMSO-d_6$ δ [ppm] = 9.50 (s, 1H, 9-CH), 8.72 (d, $^3J_{1H/2H} = 6.1$ Hz, 1H, 1-CH), 8.47 (d, $^3J_{7H/6H} = 8.2$ Hz, 1H, 7-CH), 8.38 (d, $^3J_{2H/1H} = 6.1$ Hz, 1H, 2-CH), 8.32 (d, $^3J_{5H/6H} = 7.4$ Hz, $^4J_{5H/7H} = 1.2$ Hz, 1H, 5-CH), 7.86 (dd, $^3J_{6H/5H,7H} = 7.5$ Hz, 1H, 6-CH), 3.46 (t, $^3J_{5'H/4'H} = 6.0$ Hz, 2H, 5'-CH₂), 3.40-3.38 (m, 2H, 1'-CH₂), 2.82-2.80 (m, 2H, 2'-CH₂), 2.76 (t, $^3J_{3'H/4'H} = 5.9$ Hz, 2H, 3'-CH₂), 1.69 (quin., $^3J_{4'H/3'H,5'H} = 6.0$ Hz, 2H, 4'-CH₂).

HR-MS (ESI): für $C_{14}H_{17}N_3O_2SH^+$ $[M+H]^+$, ber.: 292.1114, gef.: 292.1117.

(2-((4-(Isochinolin-5-ylsulfonyl)-1,4-diazepan-1-yl)methyl)phenyl)boronsäure (**13**)

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [mg] | V [ml] |
|---|-----------|-----------------------------|------|----------|--------|--------|
| Fasudil x TFA 10 | 405.10 | - | 1.00 | 0.12 | 47.0 | - |
| 2-Formylphenyl- boronsäure | 150.05 | - | 1.00 | 0.12 | 17.4 | - |
| NaBH₃CN | 62.84 | - | 1.30 | 0.15 | 9.50 | - |
| DIPEA | 129.25 | 0.76 | 1.00 | 0.12 | 15.0 | 0.02 |

In einem ausgeheizten Kolben wurden 17.4 mg (116 μmol , 1.00 eq) Formylphenylboronsäure in 1.00 mL MeOH gelöst und eine Lösung aus 47.0 mg (116 μmol , 1.00 eq) Fasudil **10** in 1.00 mL MeOH langsam zugetropft. In einem weiteren Kolben wurden 9.50 mg (151 μmol , 1.30 eq) NaBH_3CN in 0.20 mL MeOH gelöst, zur Reaktionslösung getropft und 15 min mit Argon gespült. Zuletzt wurden 19.7 μL (116 μmol , 1.00 eq) DIPEA hinzugegeben und unter HPLC-Kontrolle 22 h bei RT gerührt. Unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in ges. NaCl-Lösung aufgenommen und dreimal mit EtOAc gewaschen. Die vereinten org. Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt (5-50 % MeCN in H_2O , 40 min), sodass 26.0 mg (61.0 μmol , 53 %) eines gelblichen Feststoffs **13** erhalten werden konnten.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 9.72 (s, 1H, 9-CH), 8.76 (d, $^3J_{1\text{H}/2\text{H}}$ = 6.4 Hz, 1H, 1-CH), 8.62 (d, $^3J_{7\text{H}/6\text{H}}$ = 8.3 Hz, 1H, 7-CH), 8.55 (d, $^3J_{2\text{H}/1\text{H}}$ = 6.4 Hz, 1H, 2-CH), 8.47 (d, $^3J_{5\text{H}/6\text{H}}$ = 7.4 Hz, $^4J_{5\text{H}/7\text{H}}$ = 1.2 Hz, 1H, 5-

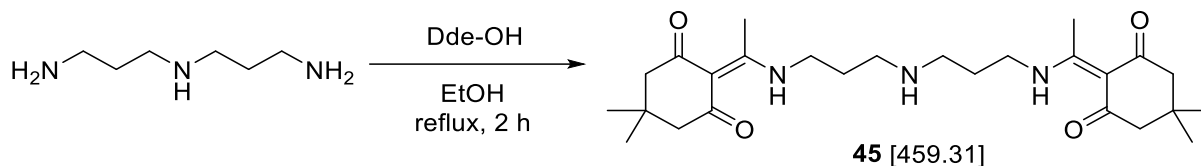
Experimenteller Teil

CH), 7.97 (dd, $^3J_{6H/5H,7H} = 7.6$ Hz, 1H, 6-CH), 7.90 (dd, $^3J_{o-H/m2-H} = 7.1$ Hz, $^4J_{o-H/p-H} = 1.5$ Hz, 1H, *o*-CH), 7.50-7.47 (m, 2H, *m*₂-, *p*-CH), 7.45-7.42 (m, 1H, *m*₁-CH), 4.55 (s, 2H, CH₂), 3.50 (bs, 4H, 3'-,5'-CH₂), 3.42 (bs, 2H, 1'-CH₂), 3.33 (bs, 2H, 2'-CH₂), 2.12 (bs, 2H, 4'-CH₂).

¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 152.0 (9-CH), 141.4 (1-CH), 135.8 (*o*-CH), 134.8 (7-CH), 134.5 (5-CH), 132.0 (*m*₁-CH), 130.2 (*p*-CH), 128.8 (*m*₂-CH), 127.6 (6-CH), 118.5 (2-CH), 60.4 (CH₂), 54.6 (2'-CH₂), 52.9 (1'-CH₂), 45.8 (3',5'-CH₂), 23.1 (4'-CH₂).

HR-MS (ESI): für C₂₁H₂₄BN₃O₄SH⁺ [M+H]⁺, ber.: 426.1653, gef.: 426.1657.

HPLC: t_R = 6.04 min, 5-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 98 %.

***N,N*-5,5'-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl-norspermidin (**45**)**

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [mg] | V [ml] |
|---------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|--------|--------|
| Norspermidin | 131.14 | 0.94 | 1.00 | 1.53 | 200 | 0.21 |
| 2-Acetyldimedon | 182.22 | - | 2.20 | 3.36 | 611 | - |

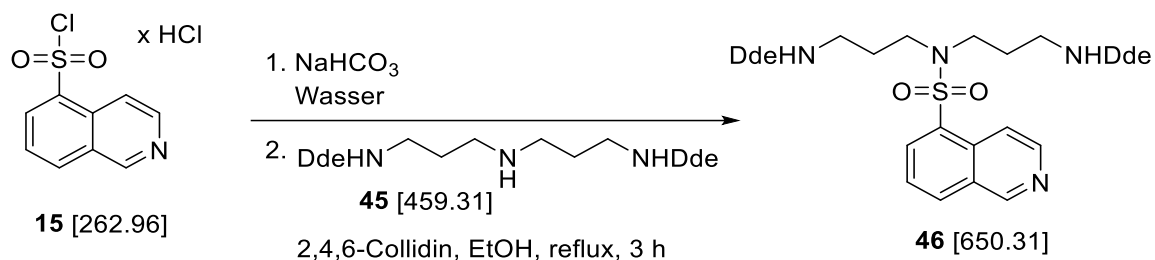
213 μ L (1.53 mmol, 1.00 eq) Norspermidin und 611 mg (3.36 mmol, 2.20 eq) 2-Acetyldimedon wurden in 20.0 mL EtOH gelöst und 2 h zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde *in vacuo* eingeeengt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 10:1 \rightarrow 5:1). Es konnten 499 mg (1.09 mmol, 71 %) eines gelblichen Feststoffs **45** erhalten werden.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 13.22 (s, 2H, 2x Dde-NH), 3.48 (t, ³*J*_{H/2H} = 6.9 Hz, 4H, 2x 3-CH₂), 2.58 (t, ³*J*_{1H/2H} = 6.6 Hz, 4H, 2x 1-CH₂), 2.48 (s, 6H, 2x Dde-CH₃), 2.26 (s, 8H, 4x Dde_{Ring}-CH₂), 1.71 (quin., ³*J*_{2H/1H,3H} = 6.7 Hz, 4H, 2x 2-CH₂), 0.94 (s, 12H, 4x Dde_{Ring}-CH₃).

HR-MS (ESI): für C₂₆H₄₁N₃O₄Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 483.2991, gef.: 483.2989.

DC: R_f = 0.13 (DCM/MeOH 10:1).

***N,N*-Bis(3-((1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexylen)ethyl)amino)propyl)isochinolin-5-sulfonamid (46)**



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [mg] | V [ml] |
|-----------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|--------|--------|
| Sulfonylchlorid x HCl | 262.96 | - | 1.00 | 0.57 | 150 | - |
| NaHCO ₃ | 84.01 | - | 1.00 | 0.57 | 47.9 | - |
| Dde-Norspermidin | 459.31 | - | 1.50 | 0.86 | 392 | - |
| 2,4,6-Collidin | 121.18 | 0.92 | 3.00 | 1.71 | 207 | 0.23 |

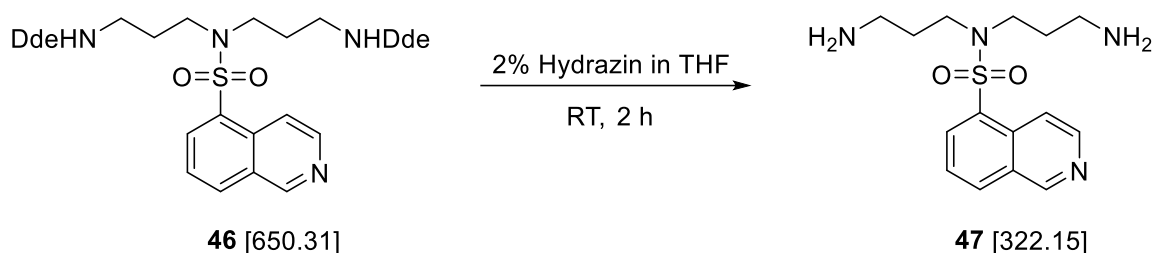
150 mg (0.57 mmol, 1.00 eq) des Sulfonylchlorids **15** wurden in 2.00 mL Wasser unter Eiskühlung suspendiert und mit 47.9 mg (0.57 mmol, 1.00 eq) NaHCO₃ versetzt. Anschließend wurde dreimal mit DCM gewaschen, die org. Phasen über MgSO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck eingeengt. In einem weiteren Kolben wurden 392 mg (0.86 mmol, 1.50 eq) Dde-Norspermidin **45** in 15.0 mL EtOH gelöst und langsam das Sulfonylchlorid, resuspendiert in 5.00 mL EtOH, hinzuge tropft. Nach 3 h Rühren unter Sieden wurde die Reaktionslösung abgekühlt, das Lösungsmittel *in vacuo* entfernt, der Rückstand mit DCM aufgenommen und zweimal mit Wasser gewaschen. Zuletzt wurde über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 10:1) lieferte 160 mg (0.25 mmol, 43 %) eines gelblichen Öls **46**.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 13.19 (t, $^3J_{\text{NH}/3\text{H}}$ = 5.2 Hz, 2H, 2x Dde-NH), 9.47 (s, 1H, 9-CH), 8.69 (d, $^3J_{1\text{H}/2\text{H}}$ = 6.1 Hz, 1H, 1-CH), 8.45 (d, $^3J_{7\text{H}/6\text{H}}$ = 8.2 Hz, 1H, 7-CH), 8.34 (dd, $^3J_{5\text{H}/6\text{H}}$ = 7.4 Hz, $^4J_{5\text{H}/7\text{H}}$ = 1.2 Hz, 1H, 5-CH), 8.32 (d, $^3J_{2\text{H}/1\text{H}}$ = 6.0 Hz, 1H, 2-CH), 7.81 (t, $^3J_{6\text{H}/5\text{H},7\text{H}}$ = 7.7 Hz, 1H, 6-CH),

Experimenteller Teil

3.37 (t, $^3J_{3'/3''H/2'/2''H} = 7.1$ Hz, 4H, 3'/3''-CH₂), 3.31 (dd, $^3J_{1'/1''H/2'/2''H} = 7.1$ Hz, 4H, 1'/1''-CH₂), 2.33 (s, 6H, 2x Dde-CH₃), 2.21 (s, 8H, 4x Dde_{Ring}-CH₂), 1.79 (quin., $^3J_{2'/2''H/1,3'/1,3''H} = 7.1$ Hz, 4H, 2'/2''-CH₂), 0.94 (s, 12H, 4x Dde_{Ring}-CH₃).

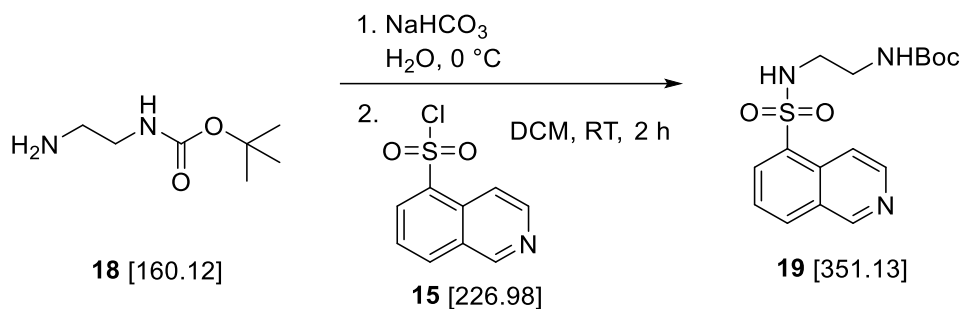
HR-MS (ESI): für C₃₅H₄₆N₄O₆SH⁺ [M+H]⁺, ber.: 651.3211, gef.: 651.3211.

***N,N*-Bis(3-aminopropyl)isochinolin-5-sulfonamid (47)**

In einem Kolben wurden 160 mg (0.25 mmol, 1.00 eq) des Dde-geschützten Sulfonamids **46** in 3.00 mL 2 %iger Hydrazin-Lösung in THF gelöst und unter DC-Kontrolle 2 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* entfernt, der Rückstand in wenig DCM aufgenommen und in kaltem Et₂O ausgefällt. Nach zweimaligem Waschen mit Et₂O wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Wasser/MeCN gelöst und gefriergetrocknet. Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC (5-50 % MeCN in 20 min) lieferten 24.0 mg (0.09 mmol, 37 %) eines weißen Feststoffs **47**.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 9.52 (s, 1H, 9-CH), 8.72 (d, $^3J_{1\text{H}/2\text{H}} = 6.2$ Hz, 1H, 1-CH), 8.51 (d, $^3J_{7\text{H}/6\text{H}} = 8.1$ Hz, 1H, 7-CH), 8.36-8.31 (m, 2H, 2,5-CH), 7.87 (t, $^3J_{6\text{H}/5\text{H},7\text{H}} = 7.7$ Hz, 1H, 6-CH), 7.70 (bs, 6H, 2x NH₃⁺), 3.38-3.34 (m, 4H, 1',1''-CH₂), 2.72 (q, $^3J_{3'/3''\text{H}/2'/2''\text{H}} = 6.5$ Hz, 4H, 3'/3''-CH₂), 1.76 (quin., $^3J_{2'/2''\text{H}/1,3'/1,3''\text{H}} = 7.1$ Hz, 4H, 2'/2''-CH₂).

HPLC: $t_R = 4.33$ min, 2-40 % B in 8 min, 0.45 mL/min, ACE UltraCore 2.5, SuperC18, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 94 %.

Tert-Butyl-(2-(isochinolin-5-sulfonamido)ethyl)carbamate (19)

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | eq | n [mmol] | m [mg] |
|---------------------------------|-----------|------|----------|--------|
| Sulfonylchlorid x HCl 15 | 262.98 | 1.00 | 0.42 | 109 |
| Natriumhydrogencarbonat | 84.01 | 1.00 | 0.42 | 34.8 |
| 1-Boc-Ethylendiamin 18 | 160.12 | 1.50 | 0.62 | 99.7 |

109 mg (0.42 mmol, 1.00 eq) des Sulfonylchlorids **15** wurden in 2.00 mL Eiswasser suspendiert und mit 34.8 mg (0.42 mmol, 1.00 eq) NaHCO₃ versetzt. Anschließend wurde dreimal mit DCM gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und unter vermindertem Druck auf ein Volumen von 1.00 mL eingengt. In einem weiteren Kolben wurden 100 mg (0.62 mmol, 1.50 eq) 1-Boc-Ethylendiamin **18** in 1.00 mL DCM gelöst und langsam mit der Sulfonylchlorid-Lösung versetzt. Nach 2 h Rühren bei RT wurde zweimal mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* das Lösungsmittel entfernt. Säulenchromatographische Aufreinigung (DCM/MeOH 40:1) lieferten 84.1 mg (0.24 mmol, 58 %) eines gelben Schaums **19**.

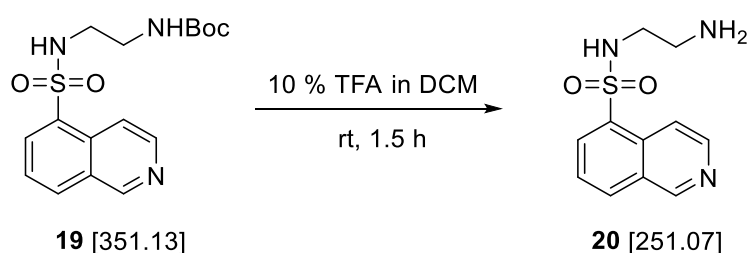
¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 9.48 (s, 1H, 9-CH), 8.69 (d, ³J_{1H/2H} = 6.1 Hz, 1H, 1-CH), 8.44 (d, ³J_{7H/6H} = 8.1 Hz, 1H, 7-CH), 8.41 (d, ³J_{2H/1H} = 6.1 Hz, 1H, 2-CH), 8.33 (d, ³J_{5H/6H} = 7.4 Hz, ⁴J_{5H/7H} = 1.2 Hz, 1H, 5-CH), 8.12 (bs, 1H, Boc-NH), 7.83 (dd, ³J_{6H/5H,7H} = 7.4, 8.1 Hz, 1H, 6-CH), 6.65 (bs, 1H, NH), 2.89 (quin, ³J_{2'H/1'H} = 6.4 Hz, 2H, 2'-CH₂), 2.83-2.79 (m, 2H, 1'-CH₂), 1.30 (s, 9H, 3x CH₃).

HR-MS (ESI): für C₁₆H₂₁N₃O₄SH⁺ [M+H]⁺, ber.: 352.1326, gef.: 352.1326.

DC: R_f = 0.29 (DCM/MeOH 20:1).

HPLC: $t_R = 5.51$ min, 10-70 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 97 %.

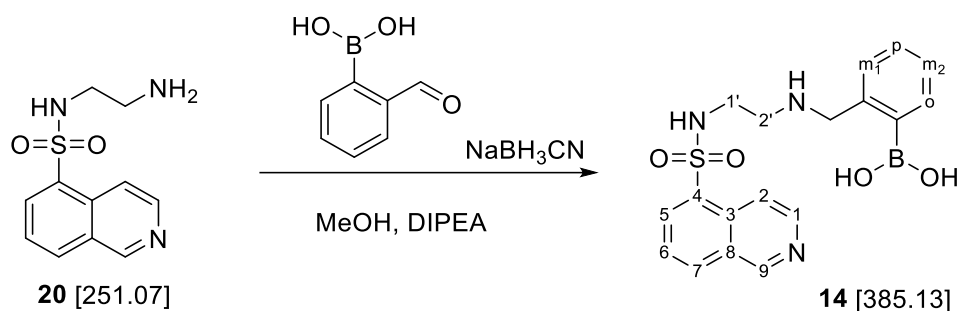
***N*-(2-Aminoethyl)isochinolin-5-sulfonamid (20)**



84.0 mg (0.23 mmol, 1.00 eq) des *tert*-Butyl-(2-(isochinolin-5-sulfonamido)ethyl)carbamats **19** wurden mit 5.00 mL 10 %iger TFA in DCM versetzt und 1.5 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung unter vermindertem Druck getrocknet, der Rückstand in DCM aufgenommen und zweimal mit ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Ein Großteil des Produkts konnte nicht aus der wässrigen Phase gewaschen werden. Zuletzt wurde die org. Phase über MgSO₄ getrocknet, *in vacuo* eingeeengt und somit 22.2 mg (0.09 mmol, 38 %) eines gelben Öls **20** erhalten.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 9.48 (s, 1H, 9-CH), 8.69 (d, $^3J_{1H/2H} = 6.2$ Hz, 1H, 1-CH), 8.45 (d, $^3J_{2H/1H} = 6.1$ Hz, 1H, 2-CH), 8.43 (d, $^3J_{7H/6H} = 8.2$ Hz, 1H, 7-CH), 8.34 (d, $^3J_{5H/6H} = 7.4$ Hz, $^4J_{5H/7H} = 1.1$ Hz, 1H, 5-CH), 7.84 (dd, $^3J_{6H/5H,7H} = 7.5$ Hz, 1H, 6-CH), 2.77 (t, $^3J_{1'H/2'H} = 6.5$ Hz, 2H, 1'-CH₂), 2.45 (t, $^3J_{2'H/1'H} = 6.5$ Hz, 2H, 2'-CH₂).

HR-MS (ESI): für C₁₁H₁₃N₃O₂SH⁺ [M+H]⁺, ber.: 252.0801, gef.: 252.0802.

(2-(((2-(Isochinolin-5-sulfonamido)ethyl)amino)methyl)phenyl)Boronsäure (14)

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [mg] | V [ml] |
|---------------------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|--------|--------|
| Amin 20 | 251.07 | - | 1.00 | 0.08 | 20.0 | - |
| 2-Formylphenylboronsäure | 150.03 | - | 1.00 | 0.08 | 12.0 | - |
| NaBH₃CN | 62.84 | - | 1.30 | 0.10 | 6.51 | - |
| DIPEA | 129.25 | 0.76 | 1.00 | 0.08 | 10.3 | 0.01 |

In einem ausgeheizten Kolben wurden 12.0 mg (79.7 μmol , 1.00 eq) Formylphenylboronsäure in 1.00 mL MeOH gelöst und langsam mit einer Lösung aus 20.0 mg (79.7 μmol , 1.00 eq) des Amins **20** in 1.00 mL MeOH versetzt. In einem weiteren Kolben wurden 6.51 mg (104 μmol , 1.30 eq) NaBH₃CN in 0.50 mL MeOH gelöst und zur Reaktionslösung getropft. Zuletzt wurden 13.5 μL (79.7 μmol , 1.00 eq) DIPEA hinzugegeben und unter HPLC-Kontrolle 15 h bei RT gerührt. Unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt und anschließend mittels semipräparativer HPLC aufgereinigt (5-50 % MeCN in H₂O, 20 min), sodass 17.1 mg (44.1 μmol , 55 %) eines weißen Feststoffs **14** erhalten werden konnten.

¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 9.53 (d, $^4J_{9H/7H}$ = 0.9 Hz, 1H, 9-CH), 8.73 (d, $^3J_{1H/2H}$ = 6.2 Hz, 1H, 1-CH), 8.55 (bs, 1H, 2'-NH), 8.49 (dt, $^3J_{7H/6H}$ = 8.3 Hz, $^4J_{7H/5H,9H}$ = 0.9 Hz, 1H, 7-CH), 8.41 (t, $^3J_{1H/2H}$ = 4.0 Hz, 1H, 1'-NH), 8.40 (dt, $^3J_{2H/1H}$ = 6.2 Hz, 1H, 2-CH), 8.36 (d, $^3J_{5H/6H}$ = 7.4 Hz, $^4J_{5H/7H}$ = 1.2 Hz, 1H, 5-CH), 7.88 (dd, $^3J_{6H/5H,7H}$ = 7.4 Hz, 1H, 6-CH), 7.83 (dd, $^3J_{m2-H/p-H}$ = 7.3 Hz, $^4J_{o-H/p-H}$ = 1.6 Hz, 1H, o-CH), 7.44 (dq, $^3J_{p-H/m2-,m1-H}$ = 7.4 Hz, $^4J_{o-H/p-H}$ = 1.6 Hz,

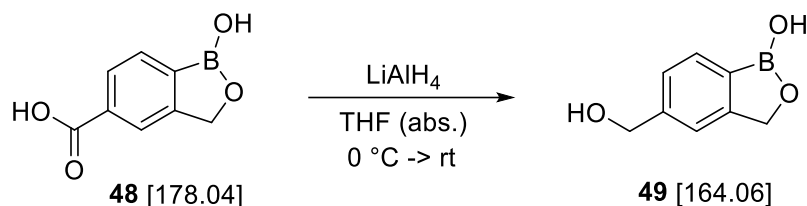
Experimenteller Teil

^1H , $p\text{-CH}$), 7.41 (dq, $^3J_{m2\text{-H}/p\text{-},o\text{-H}} = 7.4$ Hz, $^4J_{m2\text{-H}/m1\text{-H}} = 1.5$ Hz, 1H, $m_2\text{-CH}$), 7.35 (dd, $^3J_{m1\text{-H}/p\text{-H}} = 7.4$ Hz, $^4J_{m1\text{-H}/m2\text{-H}} = 1.4$ Hz, 1H, $m_2\text{-CH}$), 4.30 (t, $^3J_{6\text{H}/5\text{H},7\text{H}} = 5.3$ Hz, 2H, CH_2), 3.07 (q, $^3J_{1'\text{-H}/2'\text{-H}} = 6.5$ Hz, 2H, $1'\text{-CH}_2$), 2.96 (quin, $^3J_{1'\text{-H}/2'\text{-H}} = 6.0$ Hz, 2H, $2'\text{-CH}_2$).

^{13}C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 158.4, 158.1, 157.9 (C_q), 153.4 (9-CH), 144.5 (1-CH), 135.7 ($o\text{-CH}$), 133.8 (7-CH), 133.0 (5-CH), 131.1 ($m_1\text{-CH}$), 130.1 ($p\text{-CH}$), 128.4 ($m_2\text{-CH}$), 126.6 (6-CH), 117.1 (2-CH), 50.9 (CH_2), 46.0 ($2'\text{-CH}_2$), 38.5 ($1'\text{-CH}_2$).

HR-MS (ESI): für $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{BN}_3\text{O}_4\text{SH}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 386.1344, gef.: 386.1340.

HPLC: $t_R = 5.38$ min, 5-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5*, *SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 98 %.

4-Hydroxymethylbenzoboroxol (**49**)

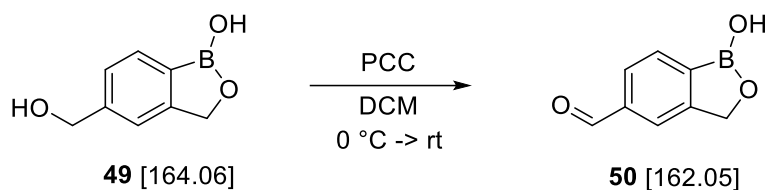
| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | eq | n [mmol] | m [mg] |
|---------------------------------|-----------|------|----------|--------|
| 4-Carboxybenzoboroxol 48 | 178.04 | 1.00 | 0.28 | 50.0 |
| Lithiumaluminiumhydrid | 37.95 | 2.00 | 0.56 | 21.3 |

Unter Argon wurden 50.0 mg (0.28 mmol, 1.00 eq) 4-Carboxybenzoboroxol **48** in 3.00 mL THF (abs.) gelöst und unter Eisbadkühlung wurden 21.3 mg (0.56 mmol, 2.00 eq) Lithiumaluminiumhydrid (LAH) langsam hinzugegeben. Die Suspension wurde über Nacht unter Rühren auf RT erwärmt. Dann wurde mit wässriger NaOH-Lösung überschüssiges LAH vernichtet und die Suspension über Kieselgur gefiltert und zweimal mit Diethylether gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels semipräparativer HPLC (7-80 % MeCN in H_2O , 20 min) aufgereinigt. Es konnten 29.4 mg (0.18 mmol, 64 %) eines weißen Feststoffs **49** erhalten werden.

^1H NMR: 600 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 9.08 (s, 1H, BOH), 7.66 (d, $^3J_{2\text{H},3\text{H}} = 7.6$ Hz, 1H, 2- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 7.34 (d, 1H, 5- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 7.27 (d, $^3J_{3\text{H},2\text{H}} = 7.6$ Hz, 1H, 3- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 5.23 (t, $^3J_{\text{OH},\text{p-CH}_2} = 5.2$ Hz, 1H, OH), 4.96 (s, 2H, 7- CH_2), 4.55 (d, $^3J_{\text{p-CH}_2,\text{OH}} = 5.1$ Hz, 2H, p- CH_2).

HR-MS (ESI): für $\text{C}_8\text{H}_9\text{BO}_3\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 187.0537, gef.: 187.0541.

HPLC: $t_{\text{R}} = 3.11$ min, 7-80 % B in 8 min, 0.45 mL/min, ACE UltraCore 2.5, SuperC18, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 64 %.

4-Formylbenzoboroxol (**50**)

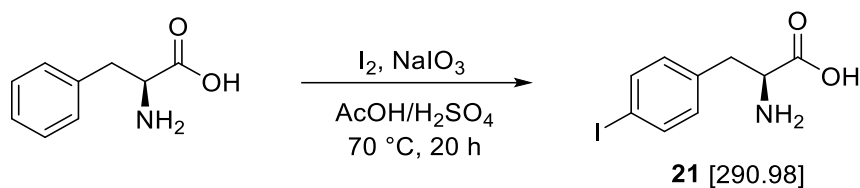
| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | eq | n [mmol] | m [mg] |
|-------------------------|-----------|------|----------|--------|
| 4-Hydroxybenzoboroxol | 164.06 | 1.00 | 0.26 | 42.0 |
| Pyridiniumchlorochromat | 215.56 | 2.00 | 0.51 | 110 |

42.0 mg (0.26 mmol, 1.00 eq) 4-Hydroxybenzoboroxol **49** wurden unter Schutzgas in 3.00 mL Aceton gelöst und bei 0 °C gerührt. Dann wurden 110 mg (0.51 mmol, 2.00 eq) PCC hinzugegeben und die Suspension über Nacht auf Raumtemperatur erwärmt. Über eine Umkehrfritte mit Silicagel wurde die Suspension filtriert und mit DCM und Aceton gewaschen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand mittels semipräparativer HPLC (10-85 % MeCN in H₂O, 20 min) aufgereinigt. Es konnten 25.3 mg (0.16 mmol, 60 %) eines gelblichen Feststoffs **50** gewonnen werden.

¹H NMR: 600 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 10.02 (s, 1H, CHO), 7.86-7.84 (m, 1H, 3-CH_{aromat.}), 7.64 (d, ³J_{2H,3H} = 7.8 Hz, 1H, 3-CH_{aromat.}), 7.58-7.55 (m, 1H, 5-CH_{aromat.}), 5.38 (bs, 1H, OH), 4.59 (s, 2H, 7-CH₂).

HPLC: t_R = 4.03 min, 7-80 % B in 8 min, 0.45 mL/min, ACE UltraCore 2.5, SuperC18, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 88 %.

6.9 Synthese von Phenylalanin-Derivaten und ihr Einsatz in der SPPS

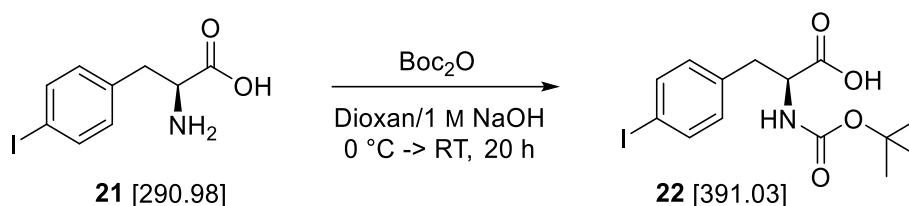
4-Iod-Phenylalanin (**21**)

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | eq | n [mmol] | m [g] |
|---------------------|-----------|------|----------|-------|
| L-Phenylalanin | 165.19 | 1.00 | 51.6 | 8.52 |
| Iod | 126.90 | 0.40 | 20.6 | 5.24 |
| Natriumiodat | 197.89 | 0.20 | 10.3 | 2.04 |

In einem Dreihalskolben wurden 8.52 g (51.6 mmol, 1.00 eq) L-Phenylalanin in einem Gemisch aus 47.0 mL Essigsäure und 6.20 mL Schwefelsäure gelöst und mit 5.24 g (20.6 mmol, 0.40 eq) Iod sowie 2.04 g (10.3 mmol, 0.20 eq) Natriumiodat versetzt. Dann wurde 20 h unter Rückfluss erhitzt und nach Abkühlen zum Beenden der Reaktion zweimal 0.20 g Natriumperiodat hinzugegeben, bis die Lösung orange wurde. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und je zweimal mit Et₂O und DCM gewaschen. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 8 M NaOH auf pH 5 eingestellt, um das Produkt als weißen Niederschlag auszufällen. Nach Waschen des Niederschlags mit Wasser und Ethanol und trocknen des Feststoffs *in vacuo* konnten 9.90 g (34.0 mmol, 66 %) eines weißen Pulvers **21** gewonnen werden.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 7.63 (d, ³J_{3,5-CH_{aromat}./2,6H} = 8.3 Hz, 2H, 3,5-CH_{aromat}.), 7.38 (bs, 2H, NH₂), 7.07 (d, ³J_{2,6-CH_{aromat}./3,5H} = 8.3 Hz, 2H, 2,6-CH_{aromat}.), 3.34 (dd, ³J_{α-H/β-proR-H} = 4.6 Hz, ³J_{α-H/β-proS-H} = 8.1 Hz, 1H, α-CH), 3.06 (dd, ³J_{β-proR-H/α-H} = 4.6 Hz, ²J = 14.3 Hz, 1H, β-proR-CH₂), 2.80 (dd, ³J_{β-proS-H/α-H} = 8.1 Hz, ²J = 14.3 Hz, 1H, β-proS-CH₂).

HR-MS (ESI): für C₉H₁₀INO₂Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 291.9829, gef.: 291.9844.

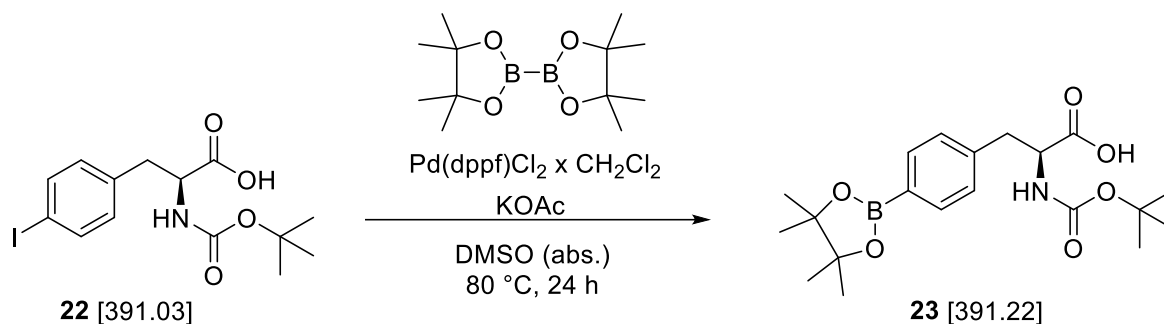
N-Boc-4-Iod-Phenylalanin (22)

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | eq | n [mmol] | m [g] |
|----------------------------------|-----------|------|----------|-------|
| 4-Iod-Phenylalanin 21 | 290.98 | 1.00 | 10.3 | 3.00 |
| Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat | 218.12 | 1.20 | 12.4 | 2.70 |

3.00 g (10.3 mmol, 1.00 eq) 4-Iod-Phenylalanin **21** wurden bei 0 °C in einem 1 M NaOH/Dioxan-Gemisch (24.0/12.0 mL) gelöst und mit 2.70 g (12.4 mmol, 1.20 eq) Boc₂O versetzt. Es wurde 20 h gerührt und dabei auf RT erwärmt. Unter vermindertem Druck wurde das Reaktionsgemisch eingeengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und zweimal mit Et₂O gewaschen. Die wässrige Phase wurde mit 2 M HCl auf pH 2 eingestellt, zweimal mit EtOAc gewaschen und die vereinten org. Phasen weitere zweimal mit ges. NaCl-Lösung gewaschen. Zuletzt wurde über MgSO₄ getrocknet und *in vacuo* das Lösungsmittel entfernt. Es konnten 3.92 g (10.0 mmol, 97 %) eines weißen Schaums **22** erhalten werden.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 12.62 (s, 1H, COOH), 7.63 (d, ³J_{3,5-CH_{aromat.}/2,6H} = 8.2 Hz, 2H, 3,5-CH_{aromat.}), 7.10 (d, ³J_{NH/α-H} = 8.4 Hz, 1H, NH), 7.06 (d, ³J_{2,6-CH_{aromat.}/3,5H} = 8.2 Hz, 2H, 2,6-CH_{aromat.}), 4.10-4.02 (m, 1H, α-CH), 2.97 (dd, ³J_{β-proR-H/α-H} = 4.7 Hz, ²J = 13.7 Hz, 1H, β-*proR*-CH₂), 2.76 (dd, ³J_{β-proS-H/α-H} = 10.4 Hz, ²J = 13.7 Hz, 1H, β-*proS*-CH₂), 1.31 (s, 9H, 3x CH₃).

HR-MS (ESI): für C₁₄H₁₈INO₄Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 414.0173, gef.: 414.0188.

(S)-2-((Tert-Butoxycarbonyl)amino)-3-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)propansäure (23)

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | eq | n [mmol] | m [mg] |
|--|-----------|------|----------|--------|
| <i>N</i> -Boc-4-Iod-Phenylalanin 22 | 391.03 | 1.00 | 2.10 | 820 |
| Bis(pinacolato)diboron | 254.19 | 1.14 | 2.40 | 610 |
| $\text{Pd(dppf)Cl}_2 \times \text{DCM}$ | 816.64 | 0.03 | 0.06 | 52.0 |
| KOAc | 97.98 | 4.00 | 8.41 | 825 |

Unter Schutzgasatmosphäre wurden 820 mg (2.10 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc-4-Iod-Phenylalanin **22**, 610 mg (2.40 mmol, 1.14 eq) Bis(pinacolato)diboron, 52.0 mg (0.06 mmol, 0.03 eq) $\text{Pd(dppf)Cl}_2 \times \text{DCM}$ und 825 mg (8.41 mmol, 4.00 eq) Kaliumacetat in einem Kolben vorgelegt und in 25.0 mL DMSO gelöst. Es wurde 24 h bei 80°C gerührt. Nach dem Abkühlen der Reaktionslösung wurde mit 150 mL EtOAc verdünnt und mit 1 M HCl sowie dreimal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde die wässrige Phase dreimal mit EtOAc gewaschen und die vereinten org. Phasen über Na_2SO_4 getrocknet. Unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt und das Rohprodukt säulenchromatographisch aufgereinigt (DCM/MeOH 40:1 \rightarrow 10:1 \rightarrow 4:1). Es konnten 602 mg (1.54 mmol, 73 %) eines bräunlichen Feststoffs **23** erhalten werden.

$^1\text{H NMR}$: 300 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 7.54 (d, $^3J_{3,5-\text{CH}_{\text{aromat.}}/2,6\text{H}} = 7.8$ Hz, 2H, 3,5- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 7.20 (d, $^3J_{2,6-\text{CH}_{\text{aromat.}}/3,5\text{H}} = 7.9$ Hz, 2H, 2,6- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 6.22 (d, $^3J_{\text{NH}/\alpha-\text{H}} = 7.0$ Hz, 1H, NH), 4.02-3.94 (m, 1H, α -CH), 3.12 (dd,

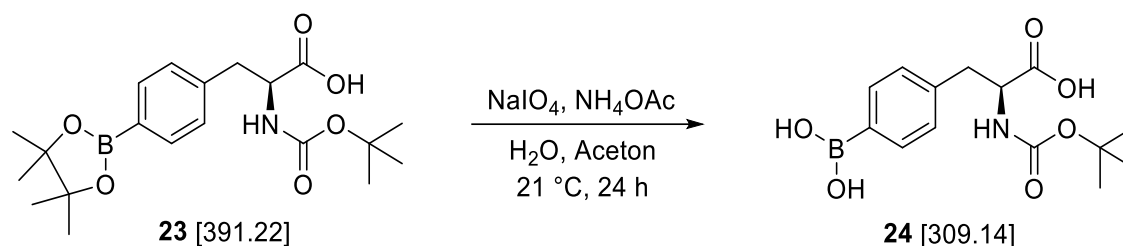
Experimenteller Teil

$^3J_{\beta\text{-proR-H}/\alpha\text{-H}} = 4.5 \text{ Hz}$, $^2J = 13.3 \text{ Hz}$, 1H, $\beta\text{-proR-CH}_2$), 2.89 (dd, $^3J_{\beta\text{-proS-H}/\alpha\text{-H}} = 7.5 \text{ Hz}$, $^2J = 13.3 \text{ Hz}$, 1H, $\beta\text{-proS-CH}_2$), 1.32 (s, 9H, 3x CH₃), 1.27 (s, 12H, 3x CH₃).

¹³C NMR: 75 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 172.3 (COOH), 154.7 (C=O), 142.6 (C_q), 134.0, 128.9 (CH_{aromat.}), 83.4 (2x Pinacol-C_q), 77.5 (Boc-C_q), 55.9 (α -CH), 37.6 (β -CH₂), 28.2 (3x Boc-CH₃), 24.6, 24.6 (4x Pinacol-CH₃).

DC: $R_f = 0.39$ (DCM/MeOH 4:1).

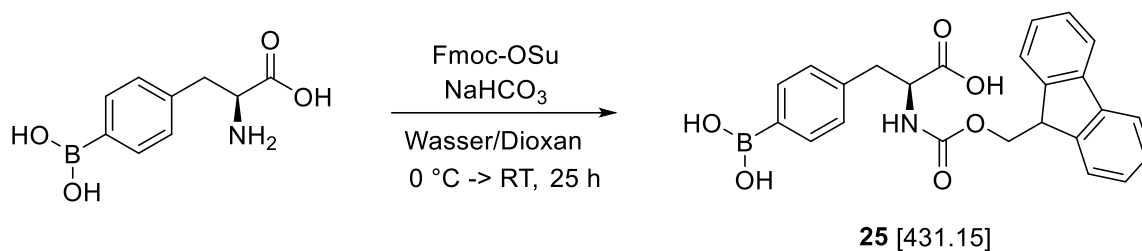
(S)-(4-(2-((*Tert*-Butoxycarbonyl)amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)phenyl)Boronsäure
(23)



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | eq | n [mmol] | m [mg] |
|---|-----------|------|----------|--------|
| <i>N</i> -Boc-4-Pinakolborono-Phenylalanin-OH 23 | 391.22 | 1.00 | 0.42 | 184 |
| Natriumperiodat | 213.87 | 6.00 | 2.52 | 539 |
| Ammoniumacetat | 77.05 | 6.50 | 2.73 | 210 |

184 mg (0.42 mmol, 1.00 eq) *N*-Boc-4-Pinakolborono-Phenylalanin **23** wurden in einem Gemisch aus H₂O/Aceton (3.00/6.00 mL) gelöst und mit 539 mg (2.52 mmol, 6.00 eq) Natriumperiodat sowie 210 mg (2.73 mmol, 6.50 eq) Ammoniumacetat versetzt. Es wurde für 24 h bei RT gerührt, bevor die Reaktionslösung mit je 10.0 mL H₂O und EtOAc verdünnt und die wässrige Phase anschließend dreimal mit EtOAc gewaschen wurde. Die vereinigten org. Phasen wurden mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und *in vacuo* eingengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 5:1) konnten 124 mg (0.35 mmol, 83 %) der Boronsäure **24** erhalten werden.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 7.81 (d, ³*J*_{3,5-CH_{aromat.}/2,6H} = 8.2 Hz, 2H, 3,5-CH_{aromat.}), 7.70 (d, ³*J*_{2,6-CH_{aromat.}/3,5H} = 8.0 Hz, 2H, 2,6-CH_{aromat.}), 4.28 (dd, ³*J*_{α-H/β-H} = 5.1, 10.1 Hz, 1H, α-CH), 3.04 (dd, ³*J*_{β-proR-H/α-H} = 5.1 Hz, ²*J* = 13.7 Hz, 1H, β-proR-CH₂), 2.86 (dd, ³*J*_{β-proS-H/α-H} = 10.1 Hz, ²*J* = 13.7 Hz, 1H, β-proS-CH₂), 1.33 (s, 9H, 3x CH₃).

(S)-2-((((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-(4-boronophenyl)propansäure (25)

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | eq | n [mmol] | m [mg] |
|------------------------------|-----------|------|----------|--------|
| 4-Borono-Phenylalanin | 209.01 | 1.00 | 0.24 | 50.0 |
| FmocOSu | 337.33 | 1.05 | 0.25 | 84.7 |
| NaHCO₃ | 84.01 | 2.00 | 0.48 | 40.3 |

50.0 mg (0.24 mmol, 1.00 eq) 4-Borono-Phenylalanin und 40.3 mg (0.48 mmol, 2.00 eq) NaHCO₃ wurden in 2.00 mL Wasser suspendiert und bei 0°C gerührt. In einem weiteren Kolben wurden 84.7 mg (0.25 mmol, 1.00 eq) FmocOSu in 2.00 mL Dioxan gelöst und zur gekühlten Reaktionslösung hinzugegeben. Nach 25 h Rühren und Erwärmen auf RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt, der Rückstand in 5 %iger HCl aufgenommen und zweimal mit EtOAc gewaschen. Die vereinten org. Phasen wurden nochmals mit 0.1 M HCl und dest. Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* das Lösungsmittel entfernt. Mittels semipräparativer HPLC (40-55 % MeCN in 30 min) wurde das Rohprodukt aufgereinigt, sodass 65.0 mg (151 µmol, 63 %) eines weißen Feststoffs **25** erhalten werden konnten.

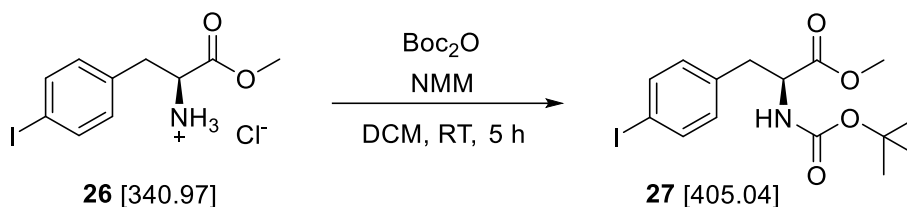
¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 12.7 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.71 (d, ³J_{3,5-CH_{aromat.}/2,6H} = 7.7 Hz, 2H, 3,5-CH_{aromat.}), 7.64 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.40 (dt, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.30 (dq, ³J = 7.5 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.23 (d, ³J_{2,6-CH_{aromat.}/3,5H} = 7.7 Hz, 2H, 2,6-CH_{aromat.}), 4.22-4.20 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.19-4.17 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.16-4.14 (m, 1H, α-CH), 3.08 (dd,

$^3J_{\beta\text{-proR-H}/\alpha\text{-H}} = 4.2 \text{ Hz}$, $^2J = 13.7 \text{ Hz}$, 1H, $\beta\text{-proR-CH}_2$), 2.87 (dd, $^3J_{\beta\text{-proS-H}/\alpha\text{-H}} = 10.6 \text{ Hz}$, $^2J = 13.7 \text{ Hz}$, 1H, $\beta\text{-proS-CH}_2$).

DC: $R_f = 0.33$ (DCM/MeOH 5:1).

HPLC: $t_R = 3.25 \text{ min}$, 40-55 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 99 %.

N-Boc-4-Iod-Phenylalanin Methylester (**27**)



| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | ρ [g/cm ³] | eq | n [mmol] | m [g] | V [ml] |
|----------------------------------|-----------|-----------------------------|------|----------|-------|--------|
| 4-Iod-Phenylalanin-OMe 26 | 340.97 | - | 1.00 | 4.54 | 1.55 | - |
| Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat | 218.12 | - | 1.30 | 5.91 | 1.29 | - |
| <i>N</i> -Methylmorpholin | 101.15 | 0.92 | 3.00 | 13.6 | 1.38 | 1.50 |

In 10.0 mL DCM wurden 1.55 g (4.54 mmol, 1.00 eq) 4-Iod-Phenylalanin-OMe **26** suspendiert und 1.29 g (5.91 mmol, 1.30 eq) Boc_2O sowie 1.50 mL (13.6 mmol, 3.00 eq) NMM zugegeben. Es wurde 5 h bei RT unter Schutzgas gerührt, bevor unter vermindertem Druck das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mit EtOAc resuspendiert wurde. Dann wurde mit ges. NaHCO_3 -Lösung, zweimal mit einer 50 mM Zitronensäure-Lösung, mit Wasser und mit ges. NaCl -Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Rohprodukt *in vacuo* eingengt.

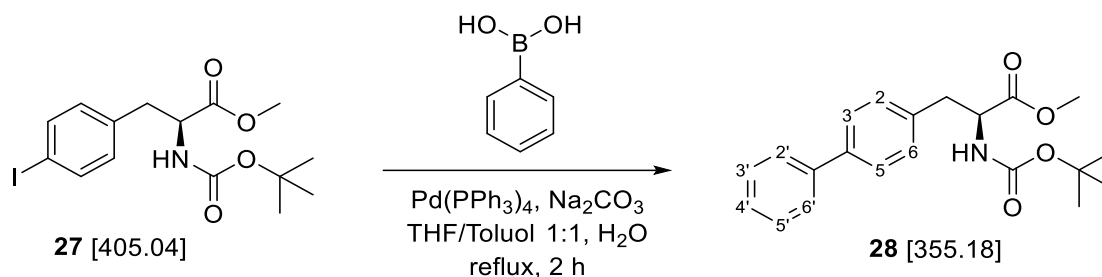
Experimenteller Teil

Zuletzt wurde mit DCM verdünnt und das Produkt aus Hexan umkristallisiert, sodass 1.44 g (3.56 mmol, 78 %) eines weißen Feststoffs **27** erhalten werden konnten.

¹H NMR: (300 MHz, 300 K, DMSO_{d6}) δ [ppm] = 7.63 (d, $^3J_{3,5-CH_{aromat.}/2,6H} = 8.2$ Hz, 2H, 3,5-CH_{aromat.}), 7.29 (d, $^3J_{NH/\alpha-H} = 8.3$ Hz, 1H, NH), 7.05 (d, $^3J_{2,6-CH_{aromat.}/3,5H} = 8.2$ Hz, 2H, 2,6-CH_{aromat.}), 4.19-4.11 (m, 1H, α -CH), 3.61 (s, 3H, OCH₃), 2.95 (dd, $^3J_{\beta-proR-H/\alpha-H} = 4.9$ Hz, $^2J = 13.7$ Hz, 1H, β -proR-CH₂), 2.79 (dd, $^3J_{\beta-proS-H/\alpha-H} = 10.4$ Hz, $^2J = 13.7$ Hz, 1H, β -proS-CH₂), 1.32 (s, 9H, 3x CH₃).

HR-MS (ESI): für C₁₅H₂₀INO₄Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 428.0340, gef.: 428.0333.

DC: R_f = 0.84 (DCM/MeOH 10:1).

N-Boc-4,4'-Bi-Phenylalanin Methylester (28)

| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | eq | n [mmol] | m [mg] |
|--|-----------|------|----------|--------|
| N-Boc-4-Iod-Phenylalanin-OMe | 405.04 | 1.00 | 0.25 | 100 |
| Phenylboronsäure | 122.05 | 2.00 | 0.49 | 60.2 |
| Na_2CO_3 | 105.99 | 2.00 | 0.49 | 52.4 |
| $\text{Pd(PPh}_3)_4$ | 1155.56 | 0.05 | 0.01 | 15.1 |

100 mg (247 μmol , 1.00 eq) der Aminosäure **27** wurden in 15.0 mL THF/Toluol gelöst und mit 60.2 mg (494 μmol , 2.00 eq) Phenylboronsäure, 52.4 mg (494 μmol , 2.00 eq) Na_2CO_3 , gelöst in 5.00 mL Wasser und zuletzt mit 15.1 mg (13.0 μmol , 0.05 eq) $\text{Pd(PPh}_3)_4$ versetzt. Die Reaktionslösung wurde 2 h bei 80 °C refluxiert und nach dem Abkühlen mit Wasser verdünnt. Es wurde mit DCM gewaschen und erneut mit Wasser und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Zuletzt wurde über MgSO_4 getrocknet, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und säulenchromatographisch (Cyclohexan/EtOAc 4:1) aufgereinigt. 46.1 mg (130 μmol , 52 %) eines weißen Feststoffs **28** konnten gewonnen werden.

$^1\text{H NMR}$: 500 MHz, 300 K, DMSO-d_6 δ [ppm] = 7.64 (dd, $^3J_{2',6'\text{-CH}_{\text{aromat.}}/3',5'\text{-H}} = 8.4$ Hz, $^4J = 1.2$ Hz, 2H, 2',6'- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 7.58 (d, $^3J_{3,5\text{-CH}_{\text{aromat.}}/2,6\text{H}} = 8.3$ Hz, 2H, 3,5- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 7.45 (t, $^3J_{3',5'\text{-CH}_{\text{aromat.}}/4'\text{-H}} = 7.4$ Hz, 2H, 3',5'- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 7.35 (d, $^3J_{4'\text{-CH}_{\text{aromat.}}/3',5'\text{-H}} = 7.4$ Hz, 1H, 4'- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 7.32 (d, $^3J_{2,6\text{-CH}_{\text{aromat.}}/3,5\text{H}} = 8.3$ Hz, 2H, 2,6- $\text{CH}_{\text{aromat.}}$), 4.23-4.18 (m, 1H, $\alpha\text{-CH}$), 3.63 (s, 3H, OCH_3), 3.04 (dd, $^3J_{\beta\text{-proS-H}/\alpha\text{-H}} = 5.0$ Hz, $^2J = 13.8$ Hz, 1H, $\beta\text{-proS-CH}_2$), 2.79 (dd,

Experimenteller Teil

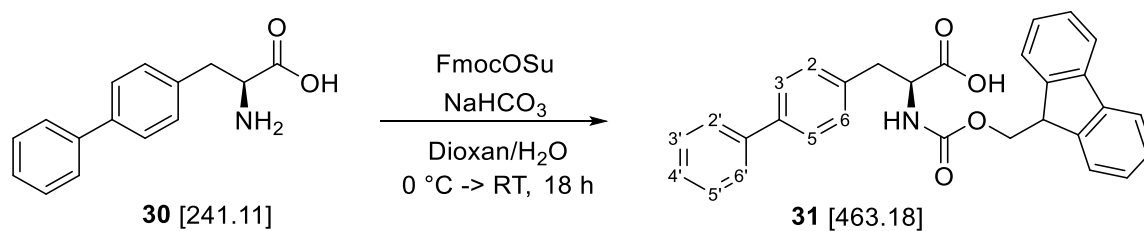
$^3J_{\beta\text{-proR-H}/\alpha\text{-H}} = 10.3 \text{ Hz}$, $^2J = 13.8 \text{ Hz}$, 1H, $\beta\text{-proR-CH}_2$), 1.32 (s, 9H, 3x Boc-CH₃).

¹³C NMR: 125 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 129.5, 128.7, 127.1, 126.3 (CH_{aromat.}), 54.9 (α -CH), 51.5 (OCH₃), 35.8 (β -CH₂), 27.8 (Boc-CH₃).

HR-MS (ESI): für C₂₁H₂₅NO₄Na⁺ [M+Na]⁺, ber.: 378.1676, gef.: 378.1673.

HPLC: $t_R = 8.85 \text{ min}$, 25-90 % B in 8 min, 0.45 mL/min, ACE UltraCore 2.5, SuperC18, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 99 %.

(S)-2-(((9H-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-([1,1'-biphenyl]-4-yl)propansäure (31)



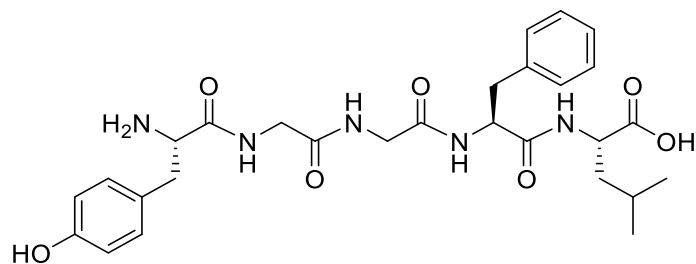
| Edukte & Reagenzien | M [g/mol] | eq | n [mmol] | m [mg] |
|------------------------------------|-----------|------|----------|--------|
| 4,4'-Bis-Phenylalanin-OH 30 | 241.11 | 1.00 | 0.83 | 200 |
| FmocOSu | 337.33 | 1.05 | 0.87 | 294 |
| NaHCO₃ | 84.01 | 2.00 | 1.66 | 139 |

200 mg (0.83 mmol, 1.00 eq) 4,4'-Bis-Phenylalanin **30** und 139 mg (1.66 mmol, 2.00 eq) NaHCO₃ wurden in 10.0 mL Wasser suspendiert und bei 0°C gerührt. In einem weiteren Kolben wurden 294 mg (0.87 mmol, 1.05 eq) FmocOSu in 10.0 mL Dioxan gelöst und zur gekühlten Reaktionslösung hinzuge tropft. Nach 18 h Rühren und Erwärmen auf RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 5 %iger HCl aufge-

nommen und zweimal mit EtOAc gewaschen. Die vereinten org. Phasen wurden nochmals mit 0.1 M HCl und dest. Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und *in vacuo* das Lösungsmittel entfernt. Mittels säulenchromatographischer Aufreinigung (DCM/MeOH 10:1) wurde das Rohprodukt aufgereinigt, sodass 251 mg (0.73 µmol, 87 %) eines weißen Feststoffs **31** erhalten werden konnten.

¹H NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 12.8 (s, 1H, COOH), 7.88 (d, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.74-7.64 (m, 2H, 2',6'-CH_{aromat.}), 7.65 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.57 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, 3',5'-CH_{aromat.}), 7.56 (d, ³J = 7.6 Hz, 2H, 3,5-CH_{aromat.}), 7.44 (t, ³J = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.43-7.37 (m, 1H, 4'-CH_{aromat.}), 7.36-7.34 (m, 2H, Fmoc-CH_{aromat.}), 7.31-7.24 (m, 2H, 2,6-CH_{aromat.}), 4.25-4.19 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.20-4.18 (m, 1H, α-CH), 4.18-4.15 (m, 1H, Fmoc-CH), 3.13 (dd, ³J_{β-proR-H/α-H} = 4.5 Hz, ²J = 13.8 Hz, 1H, β-proR-CH₂), 2.87 (dd, ³J_{β-proS-H/α-H} = 10.4 Hz, ²J = 13.8 Hz, 1H, β-proS-CH₂).

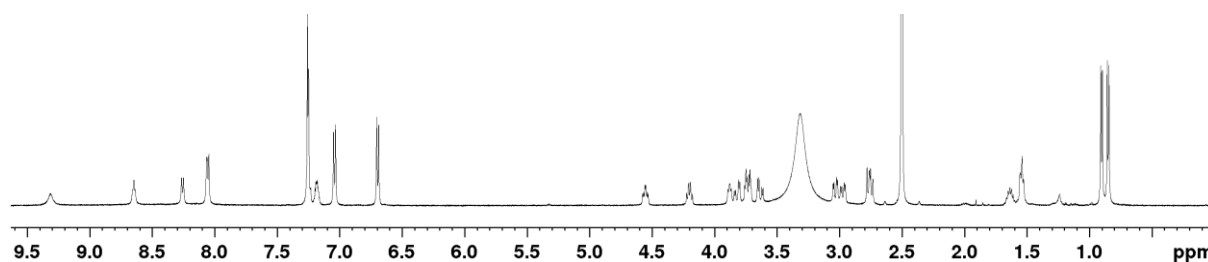
Synthese des Peptids P57 - Leu-Enkephalin



H₂N-YGGFL-OH

C₂₈H₃₇N₅O₇ [555.27]

Das Peptid **P57** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptidsynthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppen erfolgte die Abspaltung vom Harz mit wässriger TFA (95 %ig).

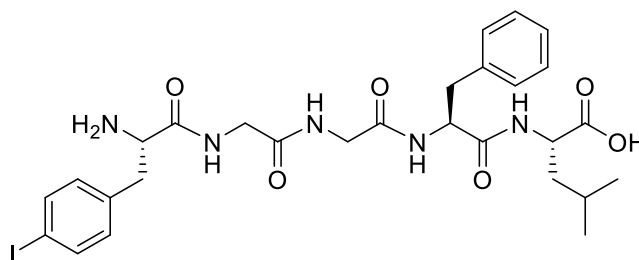


¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 9.31 (bs, 1H, OH-Tyr), 8.65 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.0$ Hz, 1H, NH-Gly²), 8.26 (d, $^3J_{\text{NH-Leu}/\alpha\text{-H}} = 7.7$ Hz, 1H, NH-Leu), 8.06 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.0$ Hz, 1H, NH-Gly³), 8.05 (d, $^3J_{\text{NH-Phe}/\alpha\text{-H}} = 8.3$ Hz, 1H, NH-Phe), 7.26-7.23 (m, 4H, 2,3,5,6-CH_{aromat.}-Phe), 7.20-7.18 (m, 1H, 4-CH_{aromat.}-Phe), 7.04 (d, $^3J_{2,6\text{-Tyr}/3,5\text{-H}} = 8.3$ Hz, 2H, 2,6-CH_{aromat.}-Tyr), 6.69 (d, $^3J_{3,5\text{-Tyr}/2,6\text{-H}} = 8.3$ Hz, 2H, 3,5-CH_{aromat.}-Tyr), 4.55 (ddd, $^3J_{\alpha\text{-Phe}/\beta\text{-H}} = 3.9, 9.5$ Hz, 1H, α -Phe), 4.20 (ddd, $^3J_{\alpha\text{-Leu}/\beta\text{-H}} = 6.1, 8.3$ Hz, 1H, α -Leu), 3.88 (dd, $^3J_{\alpha\text{-Tyr}/\beta\text{-H}} = 5.1$ Hz, 1H, α -Tyr), 3.82, 3.73 (2x dd, $^3J_{\text{Gly}/\text{NH}} = 5.4, 16.8$ Hz, 2H, α -Gly²), 3.72, 3.63 (2x dd, $^3J_{\text{Gly}/\text{NH}} = 5.9, 16.8$ Hz, 2H, α -Gly³), 3.03 (dd, $^3J_{\beta\text{-Phe}/\alpha\text{-H}} = 4.0$ Hz, $^2J = 13.9$ Hz, 1H, β -Phe), 2.97 (dd, $^3J_{\beta\text{-Tyr}/\alpha\text{-H}} = 5.2$ Hz, $^2J = 14.0$ Hz, 1H, β -Tyr), 2.76 (dd, $^3J_{\beta\text{-Tyr}/\alpha\text{-H}} = 8.3$ Hz, $^2J = 14.0$ Hz, 1H, β -Tyr), 2.75 (dd, $^3J_{\beta\text{-Phe}/\alpha\text{-H}} = 9.6$ Hz, $^2J = 13.9$ Hz, 1H, β -Phe), 1.66-1.61, 1.56-1.52 (2x m, 2H, β -Leu), 1.55-1.53 (m, 1H, γ -Leu), 0.90 (d, $^3J_{\delta\text{-Leu}/\gamma\text{-H}} = 6.5$ Hz, 3H, δ -Leu), 0.85 (d, $^3J_{\delta\text{-Leu}/\gamma\text{-H}} = 6.5$ Hz, 3H, δ -Leu).

HPLC: $t_R = 6.92$ min, 10-70 % B in 10 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C18, 3 μm , 150 x 3 mm, Reinheit: 99 %.

HR-MS (ESI): für C₂₈H₃₇N₅O₇H⁺ [M+H]⁺, ber.: 556.2766, gef.: 556.2776.

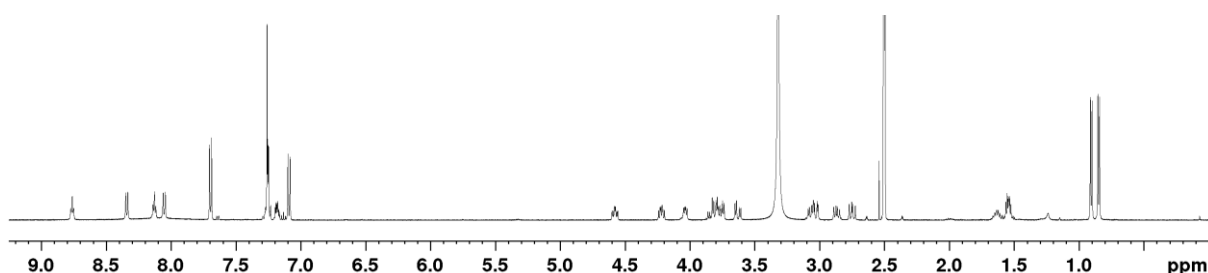
Synthese des Peptids P58 - Leu-Enkephalin mit 4IF-Mutation gegen Tyr



H₂N-4IFGGFL-OH

C₂₈H₃₆IN₅O₆ [665.17]

Das Peptid **P58** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptidsynthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppen erfolgte die Abspaltung vom Harz mit wässriger TFA (95 %ig).



¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO_{d6} δ [ppm] = 8.76 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.7$ Hz, 1H, NH-Gly²), 8.34 (d, $^3J_{\text{NH-Leu}/\alpha\text{-H}} = 7.9$ Hz, 1H, NH-Leu), 8.13 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}} = 5.7$ Hz, 1H, NH-Gly³), 8.05 (d, $^3J_{\text{NH-Phe}/\alpha\text{-H}} = 8.6$ Hz, 1H, NH-Phe), 7.69 (d, $^3J_{3,5\text{-4IF}/2,6\text{-H}} = 8.3$ Hz, 2H, 3,5-4IF), 7.26-7.23 (m, 4H, 2,3,5,6-CH-Phe), 7.20-7.17 (m, 1H, 4-CH-Phe), 7.09 (d, $^3J_{2,6\text{-Tyr}/3,5\text{-H}} = 8.3$ Hz, 2H, 2,6-4IF), 4.58 (ddd, $^3J_{\alpha\text{-Phe}/\beta\text{-H}} = 3.8, 9.2$ Hz, 1H, α -Phe), 4.22 (ddd, $^3J_{\alpha\text{-Leu}/\beta\text{-H}} = 5.7, 8.6$ Hz, 1H, α -Leu), 4.03 (dd, $^3J_{\alpha\text{-Tyr}/\beta\text{-H}} = 5.1, 8.2$ Hz, 1H, α -4IF), 3.84, 3.78 (2x dd, $^3J_{\text{Gly}/\text{NH}} = 5.8, 16.8$ Hz, 2H, α -Gly²), 3.75, 3.63 (2x dd, $^3J_{\text{Gly}/\text{NH}} = 5.6, 16.9$ Hz, 2H, α -Gly³), 3.07 (dd, $^3J_{\beta\text{-4IF}/\alpha\text{-H}} = 5.2$ Hz, $^2J = 14.1$ Hz, 1H, β -4IF), 3.03 (dd, $^3J_{\beta\text{-Phe}/\alpha\text{-H}} = 3.8$ Hz, $^2J = 13.9$ Hz, 1H, β -Phe), 2.87 (dd, $^3J_{\beta\text{-4IF}/\alpha\text{-H}} = 8.4$ Hz, $^2J = 14.1$ Hz, 1H, β -4IF), 2.75 (dd, $^3J_{\beta\text{-Phe}/\alpha\text{-H}} = 10.0$ Hz, $^2J = 13.9$ Hz, 1H, β -Phe), 1.66-1.60, 1.57-1.52 (2x m, 2H, β -Leu), 1.56-1.52 (m, 1H, γ -Leu), 0.90 (d, $^3J_{\delta\text{-Leu}/\gamma\text{-H}} = 6.5$ Hz, 3H, δ -Leu), 0.85 (d, $^3J_{\delta\text{-Leu}/\gamma\text{-H}} = 6.5$ Hz, 3H, δ -Leu).

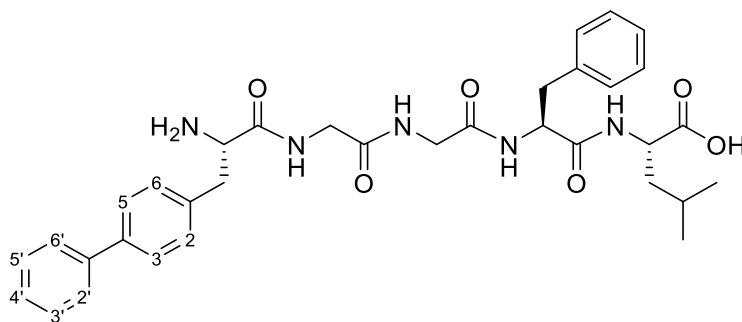
Experimenteller Teil

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μm , 35-50 % B in 30 min, 15 mL/min.

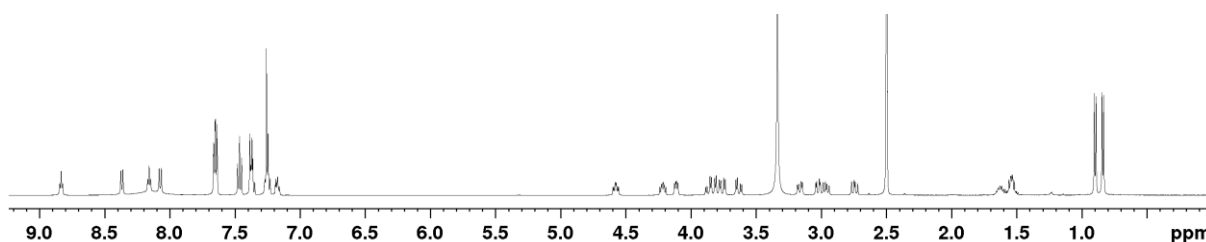
HPLC: $t_{\text{R}} = 3.84$ min, 35-50 % B in 10 min, 0.60 mL/min, *ACE 3, C18*, 3 μm , 150 x 3 mm, Reinheit: 99 %.

HR-MS (ESI): für $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{IN}_5\text{O}_6\text{H}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 666.1783, gef.: 666.1793.

Synthese des Peptids P59 - Leu-Enkephalin mit BIP-Mutation gegen Tyr

H₂N-BipGGFL-OHC₃₄H₄₁N₅O₆ [615.31]

Das Peptid **P59** wurde nach den allgemeinen Vorschriften der manuellen Festphasenpeptidsynthese unter Kapitel 6.2 auf einem 2-CTC-Harz in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach Abspaltung der letzten Fmoc-Schutzgruppen erfolgte die Abspaltung vom Harz mit wässriger TFA (95 %ig).



¹H NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-d₆ δ [ppm] = 8.84 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}}$ = 5.5 Hz, 1H, NH-Gly²), 8.37 (d, $^3J_{\text{NH-Leu}/\alpha\text{-H}}$ = 8.0 Hz, 1H, NH-Leu), 8.16 (t, $^3J_{\text{NH-Gly}/\alpha\text{-H}}$ = 5.7 Hz, 1H, NH-Gly³), 8.07 (d, $^3J_{\text{NH-Phe}/\alpha\text{-H}}$ = 8.6 Hz, 1H, NH-Phe), 7.67-7.65 (m, 2H, 3',5'-Bip), 7.64 (d, $^3J_{3,5\text{-Bip}/2,6\text{-H}}$ = 8.1 Hz, 2H, 3,5-Bip), 7.47 (t, $^3J_{2',6'\text{-Bip}/3',5'\text{-H}}$ = 7.7 Hz, 2H, 2',6'-Bip), 7.38 (d, $^3J_{2,6\text{-Bip}/3,5\text{-H}}$ = 8.1 Hz, 2H, 2,6-Bip), 7.38-7.35 (m, 1H, 4'-Bip), 7.27-7.23 (m, 4H, 2,3,5,6-CH-Phe), 7.19-7.16 (m, 1H, 4-CH-Phe), 4.58 (ddd, $^3J_{\alpha\text{-Phe}/\beta\text{-H}}$ = 3.8, 9.2 Hz, 1H, α -Phe), 4.22 (m, 1H, α -Leu), 4.11 (dd, $^3J_{\alpha\text{-Bip}/\beta\text{-H}}$ = 5.1, 8.5 Hz, 1H, α -Bip), 3.87, 3.80 (2x dd, $^3J_{\text{Gly}/\text{NH}}$ = 5.7, 16.8 Hz, 2H, α -Gly²), 3.76, 3.63 (2x dd, $^3J_{\text{Gly}/\text{NH}}$ = 5.7, 16.8 Hz, 2H, α -Gly³), 3.17 (dd, $^3J_{\beta\text{-Bip}/\alpha\text{-H}}$ = 5.0 Hz, 2J = 14.2 Hz, 1H, β -Bip), 3.03 (dd, $^3J_{\beta\text{-Phe}/\alpha\text{-H}}$ = 3.9 Hz, 2J = 13.8 Hz, 1H, β -Phe), 2.96 (dd, $^3J_{\beta\text{-Bip}/\alpha\text{-H}}$ = 8.5 Hz, 2J = 14.1 Hz, 1H, β -Bip), 2.74 (dd, $^3J_{\beta\text{-Phe}/\alpha\text{-H}}$ = 10.0 Hz, 2J = 13.9 Hz, 1H, β -

Experimenteller Teil

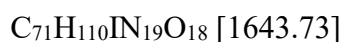
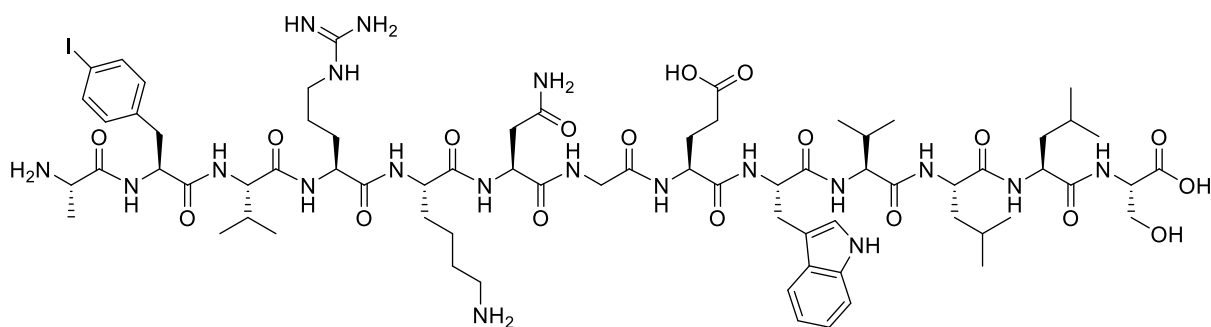
Phe), 1.66-1.59, 1.55-1.52 (2x m, 2H, β -Leu), 1.58-1.53 (m, 1H, γ -Leu), 0.90 (d, $^3J_{\delta\text{-Leu}/\gamma\text{-H}} = 6.5$ Hz, 3H, δ -Leu), 0.84 (d, $^3J_{\delta\text{-Leu}/\gamma\text{-H}} = 6.5$ Hz, 3H, δ -Leu).

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μm , 25-50 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: $t_R = 7.64$ min, 25-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 99 %.

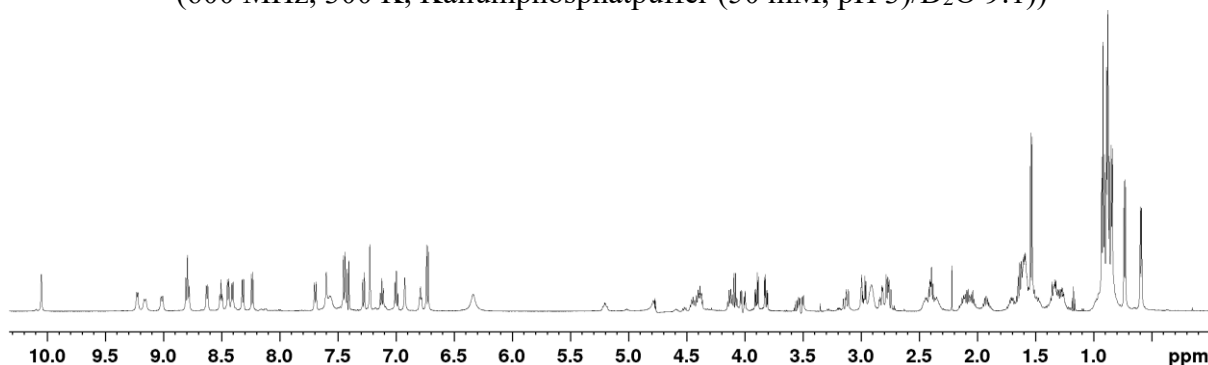
HR-MS (ESI): für $\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_6\text{Na}^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, ber.: 638.2949, gef.: 638.2955.

Synthese des Peptids P60 - Foldon-β-Hairpin (4IF¹³)¹²⁻²⁴



Das Peptid **P60** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3)/D₂O 9:1))



| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere |
|----------|------------|------|------------|------------|--|
| 12 | Ala | n.n. | 4.09 | 1.54 | |
| 13 | 4IF | 8.80 | 5.20 | 2.83, 2.77 | 2,6-H 6.73 3,5-H 7.45 |
| 14 | Val | 9.02 | 4.58 | 2.04 | H γ 0.91, 0.87 |
| 15 | Arg | 8.45 | 4.46 | 1.48, 0.90 | H γ 0.96, 0.82 H δ 2.44, 2.35 NH(Guan.) 6.79 |
| 16 | Lys | 8.79 | 4.40 | 1.64 | H γ 1.34, 1.27 H δ 1.70, 1.60 H ϵ 2.91 NH ₃ ⁺ 7.57 |
| 17 | Asn | 9.23 | 4.39 | 2.97, 2.76 | NH ₂ 7.60, 6.93 |
| 18 | Gly | 8.51 | 4.02, 3.52 | | |

Experimenteller Teil

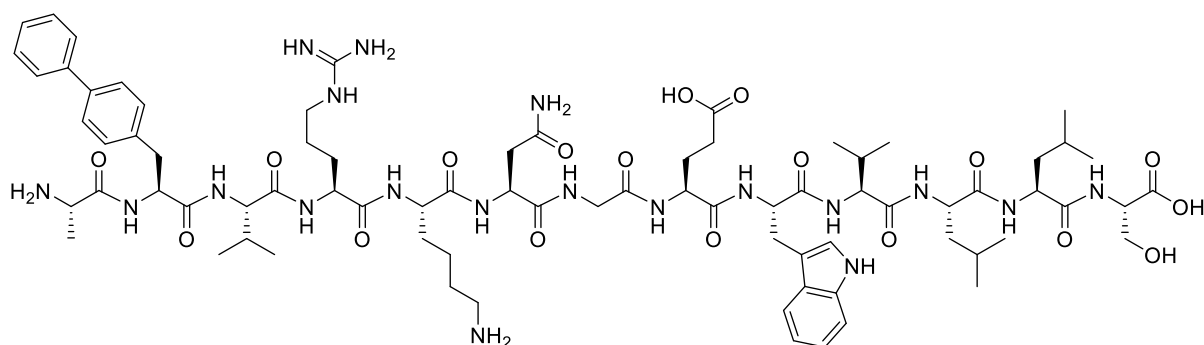
| | | | | | | |
|----|-----|------|------|------------|---------------|------------|
| 19 | Glu | 7.70 | 4.60 | 2.12, 1.91 | H γ | 2.40 |
| 20 | Trp | 8.63 | 5.02 | 3.13, 2.98 | 2-H | 7.23 |
| | | | | | 4-H | 7.12 |
| | | | | | 5-H | 7.00 |
| | | | | | 6-H | 7.28 |
| | | | | | 7-H | 7.41 |
| | | | | | NH ϵ | 10.05 |
| 21 | Val | 9.16 | 4.52 | 2.09 | H γ | 0.93, 0.88 |
| 22 | Leu | 8.41 | 4.13 | 1.60, 1.28 | H γ | 1.34 |
| | | | | | H δ | 0.73, 0.59 |
| 23 | Leu | 8.32 | 4.42 | 1.56, 1.51 | H γ | 1.60 |
| | | | | | H δ | 0.88, 0.84 |
| 24 | Ser | 8.24 | 4.37 | 3.90, 3.82 | | |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 20-50 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 5.13 min, 20-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 99 %.

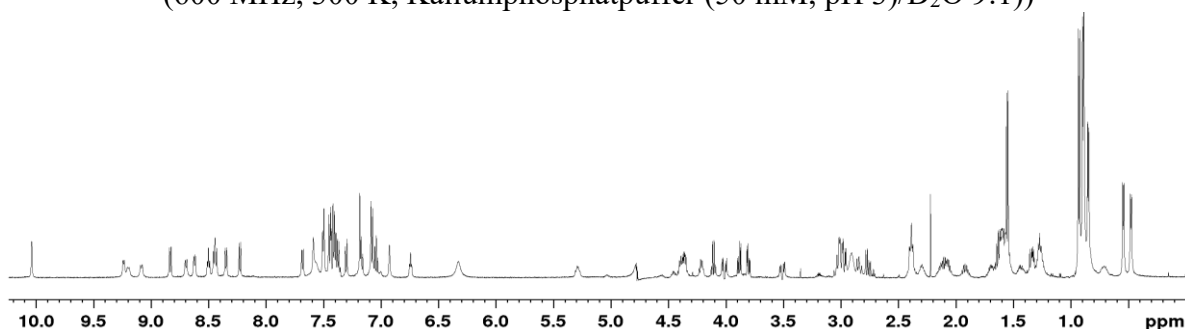
HR-MS (ESI): für $C_{71}H_{110}IN_{19}O_{18}H_2^{2+}$ $[M+2H]^{2+}$, ber.: 822.8733, gef.: 822.8738.

Synthese des Peptids P61 - Foldon-β-Hairpin (Bip¹³)¹²⁻²⁴



Das Peptid **P61** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3)/D₂O 9:1))



| Position | Aminosäure | NH | Hα | Hβ | andere | |
|----------|------------|------|------|------------|--------------------|------------|
| 12 | Ala | n.n. | 4.11 | 1.55 | | |
| 13 | Bip | 8.84 | 5.29 | 2.99, 2.85 | 2,6-H _a | 7.08 |
| | | | | | 3,5-H _a | 7.45 |
| | | | | | 2,6-H _b | 7.39 |
| | | | | | 3,5-H _b | 7.50 |
| | | | | | 4-H _b | 7.30 |
| 14 | Val | 9.09 | 4.62 | 2.11 | H _γ | 0.89 |
| 15 | Arg | 8.45 | 4.35 | 1.44, 0.88 | H _γ | 0.87, 0.72 |
| | | | | | H _δ | 2.39, 2.30 |
| | | | | | NH(Guan.) | 6.75 |
| 16 | Lys | 8.70 | 4.40 | 1.63 | H _γ | 1.35, 1.27 |
| | | | | | H _δ | 1.70, 1.60 |
| | | | | | H _ε | 2.91 |

Experimenteller Teil

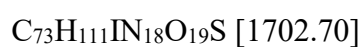
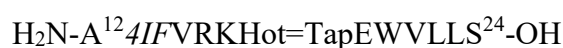
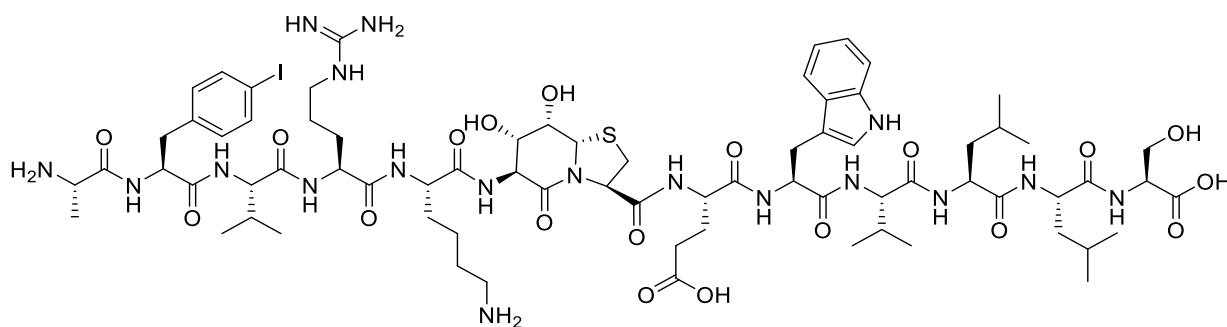
| | | | | | | |
|----|-----|------|------------|------------|------------------------------|------------|
| | | | | | NH ₃ ⁺ | 7.57 |
| 17 | Asn | 9.24 | 4.39 | 2.97, 2.76 | NH ₂ | 7.59, 6.93 |
| 18 | Gly | 8.50 | 4.01, 3.51 | | | |
| 19 | Glu | 7.68 | 4.58 | 2.14, 1.93 | H γ | 2.39 |
| 20 | Trp | 8.62 | 5.04 | 3.02 | 2-H | 7.17 |
| | | | | | 4-H | 7.18 |
| | | | | | 5-H | 7.19 |
| | | | | | 6-H | 7.04 |
| | | | | | 7-H | 7.43 |
| | | | | | NH ϵ | 10.04 |
| 21 | Val | 9.20 | 4.56 | 2.08 | H γ | 0.93 |
| 22 | Leu | 8.35 | 4.22 | 1.58, 1.28 | H γ | 1.31 |
| | | | | | H δ | 0.54, 0.48 |
| 23 | Leu | 8.44 | 4.46 | 1.62, 1.56 | H γ | 1.61 |
| | | | | | H δ | 0.89, 0.85 |
| 24 | Ser | 8.23 | 4.37 | 3.89, 3.80 | | |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 20-40 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 6.73 min, 20-40 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 97 %.

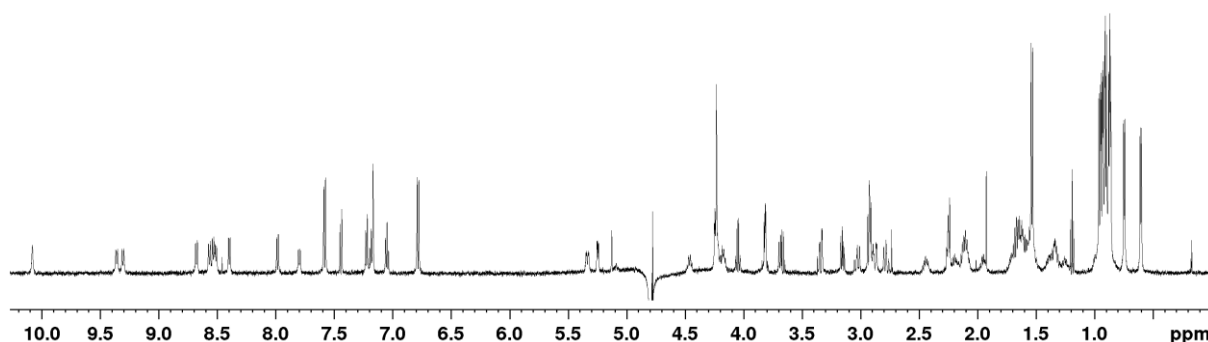
HR-MS (ESI): für C₇₇H₁₁₅N₁₉O₁₈H₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 797.9408, gef.: 797.9407.

Synthese des Peptids P62 - Foldon- β -Hairpin (4IF¹³, Hot¹⁷=Tap¹⁸)¹²⁻²⁴



Das Peptid **P62** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7)/D₂O 9:1))



| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere |
|----------|------------|------|------------|------------|---|
| 12 | Ala | n.n. | 4.05 | 1.53 | |
| 13 | 4IF | n.n. | 5.33 | 2.88, 2.79 | 2,6-H 6.78 3,5-H 7.58 |
| 14 | Val | 9.31 | 4.61 | 2.11 | H γ 0.95, 0.93 |
| 15 | Arg | 8.51 | 4.23 | 1.55, 0.88 | H γ 1.00, 0.90 H δ 2.44, 2.19 |
| 16 | Lys | 8.57 | 4.47 | 1.67 | H γ 1.38, 1.25 H δ 1.69, 1.56 H ϵ 2.92 |
| 17 | Hot | n.n. | | | 6-H 3.69 7-H 4.24 8-H 4.22 8a-H 5.13 |

Experimenteller Teil

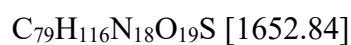
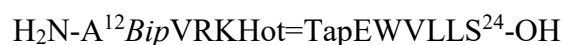
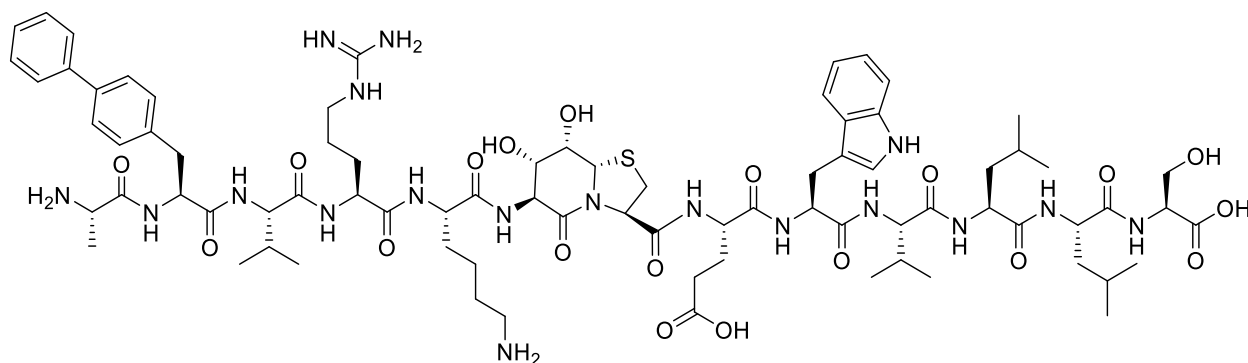
| | | | | | | |
|----|-----|------|------|------------|---------------|------------|
| 18 | Tap | | | | 3-H | 5.25 |
| | | | | | 2-H | 3.34, 3.15 |
| 19 | Glu | 7.80 | 4.67 | 2.10, 1.95 | H γ | 2.25 |
| 20 | Trp | 8.68 | 5.09 | 3.03, 2.91 | 2-H | 7.17 |
| | | | | | 4-H | 7.18 |
| | | | | | 5-H | 7.05 |
| | | | | | 6-H | 7.22 |
| | | | | | 7-H | 7.44 |
| | | | | | NH ϵ | 10.08 |
| 21 | Val | 9.36 | 4.68 | 2.09 | H γ | 0.92, 0.88 |
| 22 | Leu | 8.40 | 4.17 | 1.64, 1.34 | H γ | 1.33 |
| | | | | | H δ | 0.74, 0.60 |
| 23 | Leu | 8.54 | 4.45 | 1.63, 1.56 | H γ | 1.62 |
| | | | | | H δ | 0.90, 0.86 |
| 24 | Ser | 7.98 | 4.25 | 3.81 | | |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 20-50 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 6.62 min, 20-50 % B in 10 min, 0.60 mL/min, *ACE 3, C18*, 3 μ m, 150 x 3 mm, Reinheit: > 99 %.

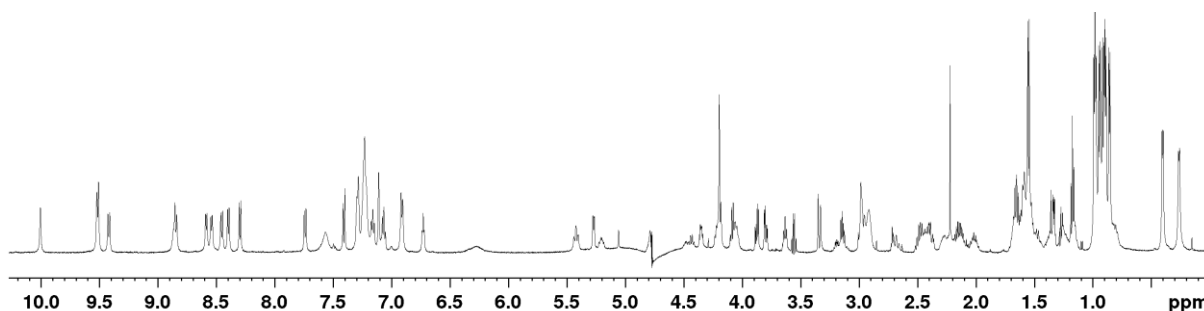
HR-MS (ESI): für $C_{73}H_{111}IN_{18}O_{19}H_2^{2+}$ $[M+2H]^{2+}$, ber.: 852.3605, gef.: 852.3592.

Synthese des Peptids P63 - Foldon-β-Hairpin (Bip¹³, Hot¹⁷=Tap¹⁸)¹²⁻²⁴



Das Peptid **P63** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3)/D₂O 9:1))



| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|--------------------|------------|
| 12 | Ala | n.n. | 4.09 | 1.55 | | |
| 13 | Bip | 8.85 | 5.42 | 2.95, 2.69 | 2,6-H _a | 6.91 |
| | | | | | 3,5-H _a | 7.22 |
| | | | | | 2,6-H _b | 7.24 |
| | | | | | 3,5-H _b | 7.30 |
| | | | | | 4-H _b | 7.23 |
| 14 | Val | 9.42 | 4.76 | 2.11 | H γ | 0.97, 0.94 |
| 15 | Arg | 8.40 | 4.06 | 1.47, 0.89 | H γ | 0.92, 0.81 |
| | | | | | H δ | 2.43, 2.19 |
| | | | | | NH(Guan.) | 6.73 |
| 16 | Lys | 8.46 | 4.44 | 1.65 | H γ | 1.35, 1.25 |
| | | | | | H δ | 1.67, 1.53 |

Experimenteller Teil

| | | | | | | |
|----|-----|------|------|------------|------------------------------|------------|
| | | | | | Hε | 2.92 |
| | | | | | NH ₃ ⁺ | 7.57 |
| 17 | Hot | 9.51 | | | 6-H | 3.63 |
| | | | | | 7-H | 4.19 |
| | | | | | 8-H | 4.20 |
| | | | | | 8a-H | 5.06 |
| 18 | Tap | | | | 3-H | 5.27 |
| | | | | | 2-H | 3.34, 3.14 |
| 19 | Glu | 7.74 | 4.80 | 2.27, 2.01 | Hγ | 2.48, 2.37 |
| 20 | Trp | 8.87 | 5.21 | 2.98 | 2-H | 7.12 |
| | | | | | 4-H | 7.16 |
| | | | | | 5-H | 7.07 |
| | | | | | 6-H | 7.29 |
| | | | | | 7-H | 7.41 |
| | | | | | NHε | 10.01 |
| 21 | Val | 9.52 | 4.73 | 2.16 | Hγ | 0.98, 0.91 |
| 22 | Leu | 8.54 | 4.22 | 1.59, 1.37 | Hγ | n.n |
| | | | | | Hδ | 0.40, 0.26 |
| 23 | Leu | 8.59 | 4.48 | 1.59, 1.52 | Hγ | n.n |
| | | | | | Hδ | 0.89, 0.86 |
| 24 | Ser | 8.30 | 4.36 | 3.88, 3.80 | | |

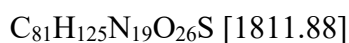
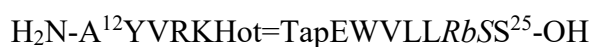
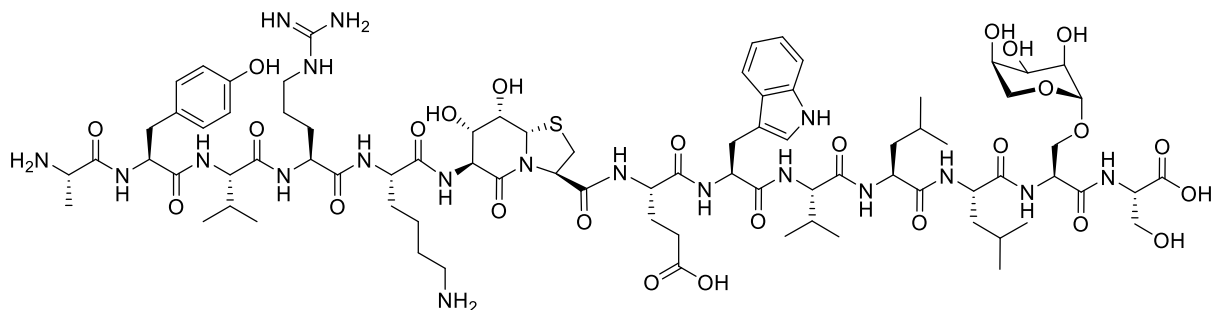
Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μm, 20-50 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 5.52 min, 20-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

HR-MS (ESI): für C₇₉H₁₁₆N₁₈O₁₉SH₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 827.9280, gef.: 827.9291.

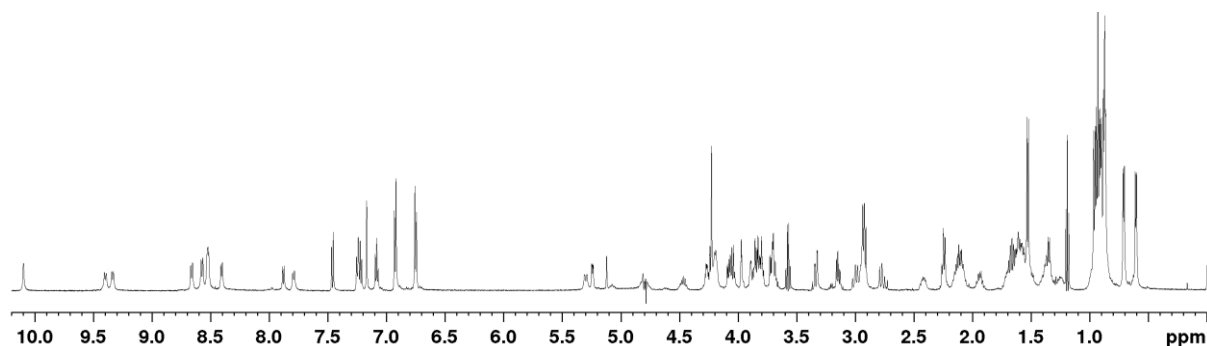
6.10 Einbau glykosylierter Bausteine in bekannte Peptidstrukturen des Arbeitskreises

Synthese des Peptids P40 - Foldon- β -Hairpin (Hot¹⁷=Tap¹⁸, RbS²⁴)¹²⁻²⁵



Das Peptid **P40** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7)/D₂O 9:1))



| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere |
|----------|------------|------|------------|------------|--|
| 12 | Ala | n.n. | 4.05 | 1.53 | |
| 13 | Tyr | 8.40 | 5.30 | 2.95, 2.77 | 2,6-H 6.92 3,5-H 6.75 |
| 14 | Val | 9.34 | 4.71 | 2.11 | H γ 0.96, 0.94 |
| 15 | Arg | 8.53 | 4.19 | 1.51, 0.87 | H γ 0.98, 0.87 H δ 2.42, 2.15 |

Experimenteller Teil

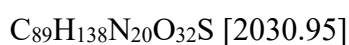
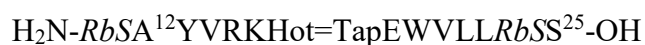
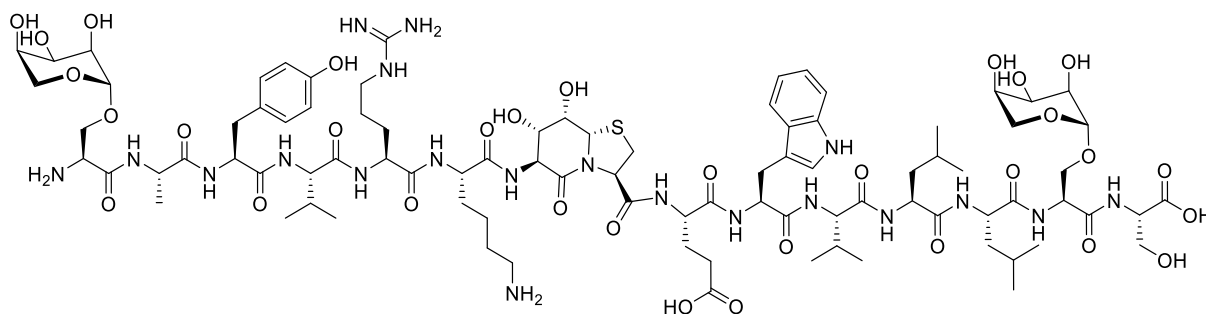
| | | | | | | |
|----|-----|------|------|------------|-------------------|------------|
| 16 | Lys | 8.57 | 4.46 | 1.66 | H γ | 1.39, 1.25 |
| | | | | | H δ | 1.71, 1.56 |
| | | | | | H ϵ | 2.92 |
| 17 | Hot | n.n. | | | 6-H | 3.68 |
| | | | | | 7-H | 4.23 |
| | | | | | 8-H | 4.24 |
| | | | | | 8a-H | 5.12 |
| 18 | Tap | | | | 3-H | 5.24 |
| | | | | | 2-H | 3.33, 3.14 |
| 19 | Glu | 7.79 | 4.67 | 2.09, 1.94 | H γ | 2.25 |
| 20 | Trp | 8.66 | 5.07 | 3.00, 2.94 | 2-H | 7.17 |
| | | | | | 4-H | 7.22 |
| | | | | | 5-H | 7.08 |
| | | | | | 6-H | 7.25 |
| | | | | | 7-H | 7.46 |
| | | | | | NH ϵ | 10.10 |
| 21 | Val | 9.40 | 4.61 | 2.13 | H γ | 0.93, 0.87 |
| 22 | Leu | 8.52 | 4.20 | 1.60, 1.36 | H γ | 1.59 |
| | | | | | H δ | 0.71, 0.61 |
| 23 | Leu | 8.41 | 4.48 | 1.58 | H γ | 1.49 |
| | | | | | H δ | 0.90, 0.87 |
| 24 | RbS | 8.58 | 4.63 | 4.08, 3.79 | 1-CH | 4.78 |
| | | | | | 2-CH | 3.71 |
| | | | | | 3-CH | 3.97 |
| | | | | | 4-CH | 3.89 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.81, 3.71 |
| 25 | Ser | 7.88 | 4.27 | 3.86, 3.82 | | |

Semipräp-HPLC: *ACE 5, SuperC18*, 150 x 10 mm, 12-40 % B in 20 min, 7.0 mL/min.

HPLC: t_R = 5.57 min, 12-40 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

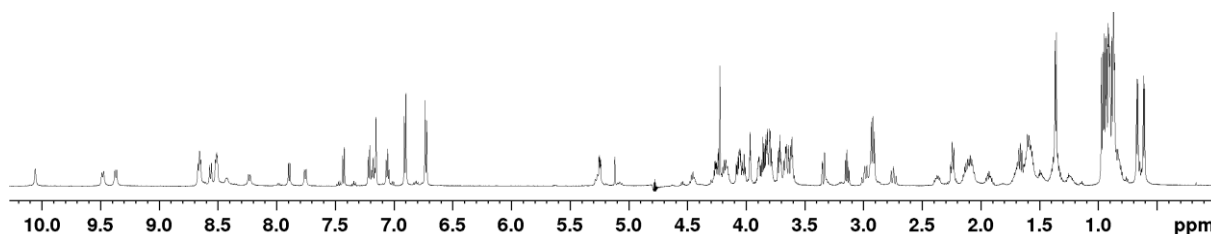
HR-MS (ESI): für C₈₁H₁₂₅N₁₉O₂₆SH₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 907.9528, gef.: 907.9533.

Synthese des Peptids **P41** - Foldon- β -Hairpin (RbS¹¹, Hot¹⁷=Tap¹⁸, RbS²⁴)¹¹⁻²⁵



Das Peptid **P41** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7)/D₂O 9:1))



| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-------------------|------------|
| 11 | RbS | n.n. | 4.68 | 4.02, 3.79 | 1-CH | 4.70 |
| | | | | | 2-CH | 3.60 |
| | | | | | 3-CH | 3.96 |
| | | | | | 4-CH | 3.82 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.64, 3.60 |
| 12 | Ala | 8.51 | 4.38 | 1.36 | | |
| 13 | Tyr | 8.23 | 5.27 | 2.93, 2.75 | 2,6-H | 6.91 |
| | | | | | 3,5-H | 6.73 |
| 14 | Val | 9.37 | 4.74 | 2.08 | H γ | 0.97, 0.92 |
| 15 | Arg | 8.51 | 4.17 | 1.49, 0.83 | H γ | 0.98, 0.86 |
| | | | | | H δ | 2.37, 2.12 |
| 16 | Lys | 8.56 | 4.46 | 1.66 | H γ | 1.39, 1.23 |

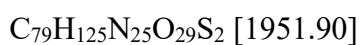
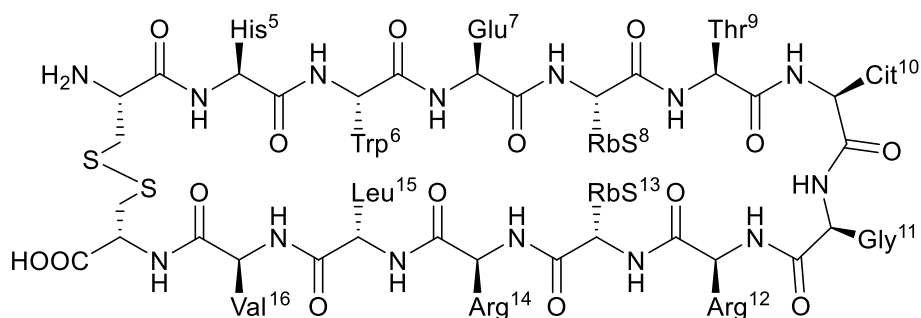
Experimenteller Teil

| | | | | | | |
|----|-----|------|------|------------|-------------------|------------|
| | | | | | Hδ | 1.70, 1.56 |
| | | | | | Hε | 2.92 |
| 17 | Hot | n.n. | | | 6-H | 3.66 |
| | | | | | 7-H | 4.22 |
| | | | | | 8-H | 4.23 |
| | | | | | 8a-H | 5.12 |
| 18 | Tap | | | | 3-H | 5.25 |
| | | | | | 2-H | 3.34, 3.14 |
| 19 | Glu | 7.76 | 4.68 | 2.08, 1.93 | Hγ | 2.24 |
| 20 | Trp | 8.67 | 5.08 | 2.99, 2.94 | 2-H | 7.15 |
| | | | | | 4-H | 7.18 |
| | | | | | 5-H | 7.06 |
| | | | | | 6-H | 7.22 |
| | | | | | 7-H | 7.43 |
| | | | | | NHε | 10.06 |
| 21 | Val | 9.48 | 4.71 | 2.13 | Hγ | 0.94, 0.89 |
| 22 | Leu | 8.52 | 4.19 | 1.62, 1.33 | Hγ | 1.59 |
| | | | | | Hδ | 0.67, 0.61 |
| 23 | Leu | 8.65 | 4.44 | 1.58, 1.24 | Hγ | 1.49 |
| | | | | | Hδ | 0.89, 0.86 |
| 24 | RbS | 8.43 | 4.62 | 4.07, 3.79 | 1-CH | 4.81 |
| | | | | | 2-CH | 3.70 |
| | | | | | 3-CH | 3.96 |
| | | | | | 4-CH | 3.89 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.79, 3.71 |
| 25 | Ser | 7.89 | 4.27 | 3.87, 3.83 | | |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 µm, 15-50 % B in 30 min, 15 mL/min.

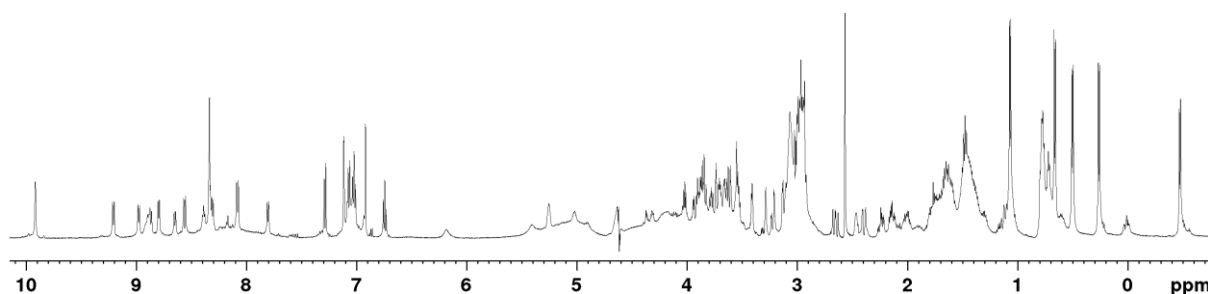
HPLC: $t_R = 3.77$ min, 15-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 89 %.

HR-MS (ESI): für $C_{89}H_{138}N_{20}O_{32}SH_2^{2+}$ $[M+2H]^{2+}$, ber.: 1016.9841, gef.: 1016.9841.

Synthese des Peptids **P39** - Filaggrin (RbS^{8,13})⁴⁻¹⁷

Das Peptid **P39** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspalllösung B verwendet. Im Anschluss an die Gefriertrocknung wurde eine Oxidation der Cysteine zum entsprechenden Disulfid durchgeführt. Dafür wurde das Peptid in Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (pH = 8.7) suspendiert ($c_{\text{Peptid}} \sim 0.5 \text{ mM}$) und unter HPLC-Kontrolle im geöffneten Kolben mit Luftsauerstoff für 2-3 Tage intramolekular zum Cystin oxidiert. Nach erneuter Gefriertrocknung und Aufreinigung des Rohprodukts mittels semi-präparativer HPLC, konnte das zyklisierte Peptid erhalten werden.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7)/D₂O 9:1))



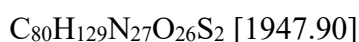
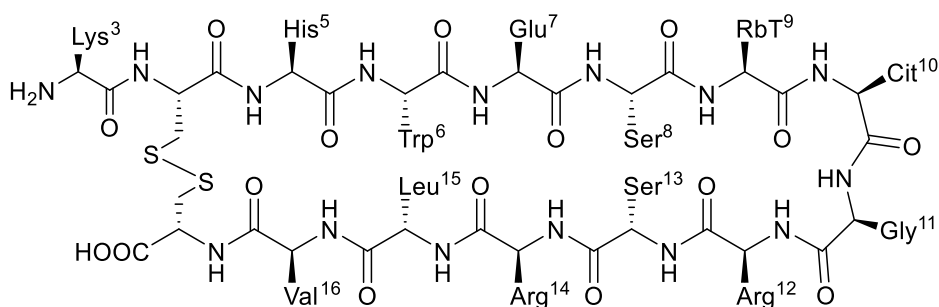
Experimenteller Teil

| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-------------------|-------------|
| 4 | Cys | n.n | 4.56 | 3.00, 2.40 | | |
| 5 | His | 8.92 | 4.72 | 3.22, 3.12 | 2-H | 8.34 |
| | | | | | 5-H | 6.92 |
| 6 | Trp | 8.80 | 4.91 | 2.94, 2.93 | 2-H | 7.12 |
| | | | | | 4-H | 7.07 |
| | | | | | 5-H | 6.75 |
| | | | | | 6-H | 7.02 |
| | | | | | 7-H | 7.29 |
| | | | | | NH ϵ | 9.92 |
| 7 | Glu | 9.21 | 4.70 | 2.01, 1.70 | H γ | 2.24, 2.14 |
| 8 | RbS | 8.87 | 5.03 | 3.78, 3.70 | 1-CH | 4.37 |
| | | | | | 2-CH | 2.48 |
| | | | | | 3-CH | 3.41 |
| | | | | | 4-CH | 3.29 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 2.98, 2.93 |
| 9 | Thr | 8.31 | 4.32 | 4.02 | H γ | 1.07 |
| 10 | Cit | 8.89 | 3.89 | 1.80, 1.64 | H γ | 1.43, 1.38 |
| | | | | | H δ | 2.97 |
| | | | | | NH(Urea) | 6.19, 5.41 |
| 11 | Gly | 8.39 | 3.93, 3.62 | | | |
| 12 | Arg | 7.81 | 4.20 | 1.76, 1.66 | H γ | 1.48 |
| | | | | | H δ | 3.07 |
| | | | | | NH(Guan.) | 6.19 |
| 13 | RbS | 8.65 | 5.26 | 3.87, 3.66 | 1-CH | 4.37 |
| | | | | | 2-CH | 2.48 |
| | | | | | 3-CH | 3.41 |
| | | | | | 4-CH | 3.29 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 2.98, 2.93 |
| 14 | Arg | 8.98 | 4.19 | 1.63 | H γ | 1.41, 1.31 |
| | | | | | H δ | 2.96 |
| | | | | | NH(Guan.) | 6.19 |
| 15 | Leu | 8.33 | 3.54 | 1.23, 0.01 | H γ | 0.60 |
| | | | | | H δ | -0.47, 0.26 |
| 16 | Val | 8.56 | 3.85 | 1.05 | H γ | 0.66, 0.50 |
| 17 | Cys | 8.08 | 4.37 | 3.02, 2.65 | | |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 15-35 % B in 50 min, 15 mL/min.

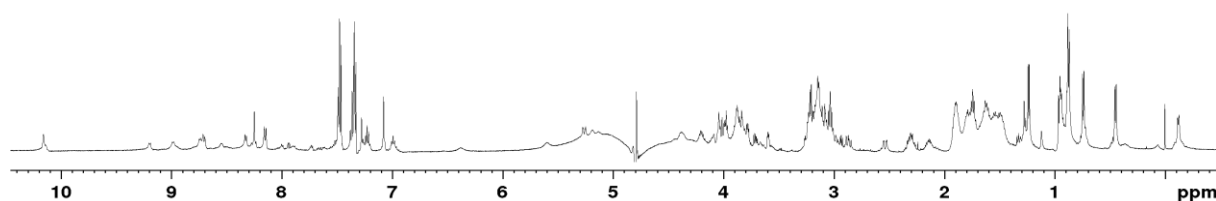
HPLC: t_R = 4.10 min, 15-30 % B in 10 min, 0.6 mL/min, *ACE 3, C18*, 3 μ m, 150 x 3 mm, Reinheit: 97 %.

HR-MS (ESI): für C₇₉H₁₂₅N₂₅O₂₉S₂H₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 976.9331, gef.: 976.9318.

Synthese des Peptids P38 - Filaggrin (RbT⁹)⁴⁻¹⁷

Das Peptid **P38** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet. Im Anschluss an die Gefriertrocknung wurde eine Oxidation der Cysteine zum entsprechenden Disulfid durchgeführt. Dafür wurde das Peptid in Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (pH = 8.7) suspendiert ($c_{\text{Peptid}} \sim 0.5 \text{ mM}$) und unter HPLC Kontrolle im geöffneten Kolben mit Luftsauerstoff für 2-3 Tage intramolekular zum Cystin oxidiert. Nach erneuter Gefriertrocknung und Aufreinigung des Rohprodukts mittels semi-präparativer HPLC, konnte das zyklisierte Peptid erhalten werden.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7)/D₂O 9:1))



¹H-NMR: siehe Peptid 26

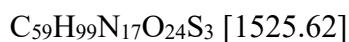
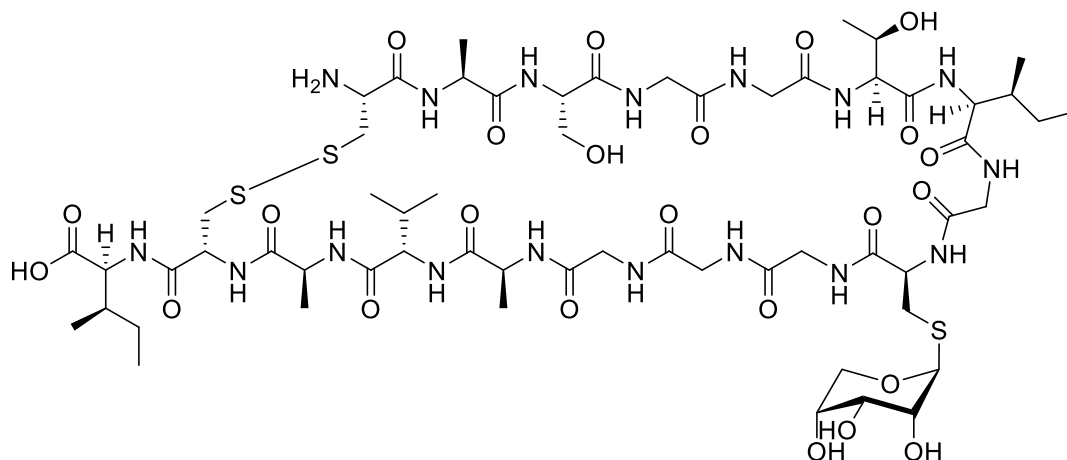
Semipräp-HPLC: ACE 5, SuperC18, 150 x 10 mm, 15-30 % B in 20 min, 7.5 mL/min.

HPLC: $t_R = 5.50 \text{ min}$, 10-40 % B in 10 min, 0.45 mL/min, ACE UltraCore 2.5, SuperC18, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 97 %.

HR-MS (ESI): für $\text{C}_{80}\text{H}_{129}\text{N}_{27}\text{O}_{26}\text{S}_2\text{H}_2^{2+}$ [$\text{M}+2\text{H}$]²⁺, ber.: 975.4607, gef.: 975.4605.

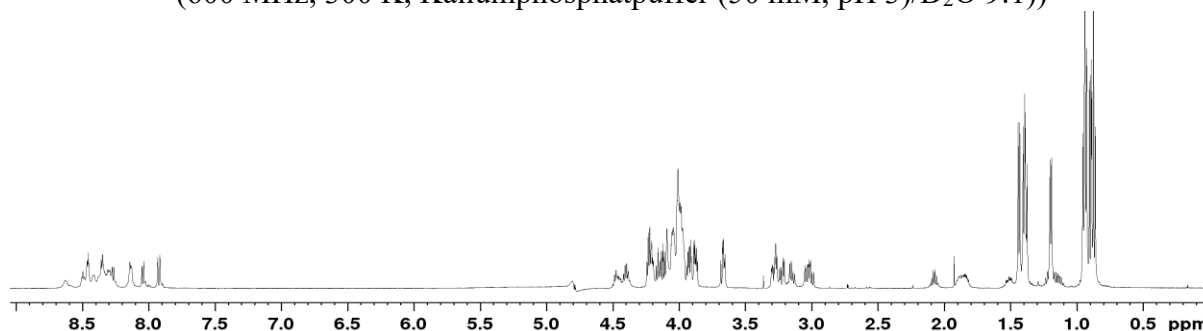
6.11 Einbau der RAS-Bausteine in natürlich vorkommende, glykosylierte Peptidsequenzen

Synthese des Peptids P47 - Sublancin 168 (RbC²²)¹⁴⁻²⁹



Das Peptid **P47** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspalllösung B verwendet. Im Anschluss an die Gefriertrocknung wurde eine Oxidation der Cysteine zum entsprechenden Disulfid durchgeführt. Dafür wurde das Peptid in Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (pH = 8.7) suspendiert ($c_{\text{Peptid}} \sim 0.5 \text{ mM}$) und unter HPLC Kontrolle im geöffneten Kolben mit Luftsauerstoff für 2-3 Tage intramolekular zum Cystin oxidiert. Nach erneuter Gefriertrocknung und Aufreinigung des Rohprodukts mittels semi-präparativer HPLC, konnte das zyklisierte Peptid erhalten werden.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

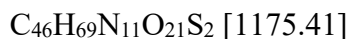
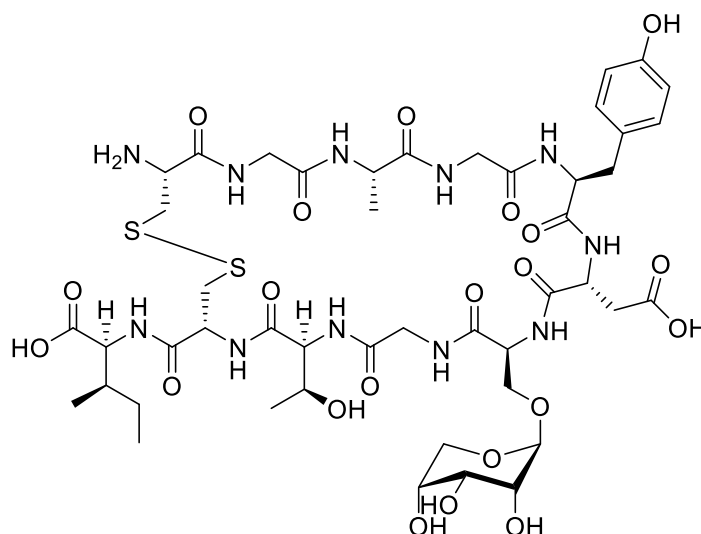
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-------------------|------------|
| 14 | Cys | n.n | 4.23 | 3.27, 3.15 | | |
| 15 | Ala | 8.36 | 4.39 | 1.38 | | |
| 16 | Ser | 8.42 | 4.49 | 3.93, 3.87 | | |
| 17 | Gly | 8.46 | 4.02 | | | |
| 18 | Gly | 8.32 | 4.02 | | | |
| 19 | Thr | 8.13 | 4.45 | 4.22 | H γ | 1.20 |
| 20 | Ile | 8.27 | 4.20 | 1.88 | H γ | 1.51, 1.22 |
| | | | | | H δ | 0.93, 0.88 |
| 21 | Gly | 8.50 | 4.02 | | | |
| 22 | RbC | 8.37 | 4.64 | 3.22, 3.00 | 1-CH | 4.89 |
| | | | | | 2-CH | 3.65 |
| | | | | | 3-CH | 3.88 |
| | | | | | 4-CH | 4.09 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.92, 3.67 |
| 23 | Gly | 8.63 | 4.02 | | | |
| 24 | Gly | 8.31 | 4.02 | | | |
| 25 | Gly | 8.30 | 4.02 | | | |
| 26 | Ala | 8.15 | 4.41 | 1.40 | | |
| 27 | Val | 8.05 | 4.16 | 2.08 | H γ | 0.95, 0.94 |
| 28 | Ala | 8.15 | 4.48 | 1.44 | | |
| 29 | Cys | 8.46 | 4.70 | 3.29, 3.03 | | |
| 30 | Ile | 7.92 | 4.12 | 1.84 | H γ | 1.41, 1.14 |
| | | | | | H δ | 0.90, 0.88 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 5-50 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 6.27 min, 5-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 97 %.

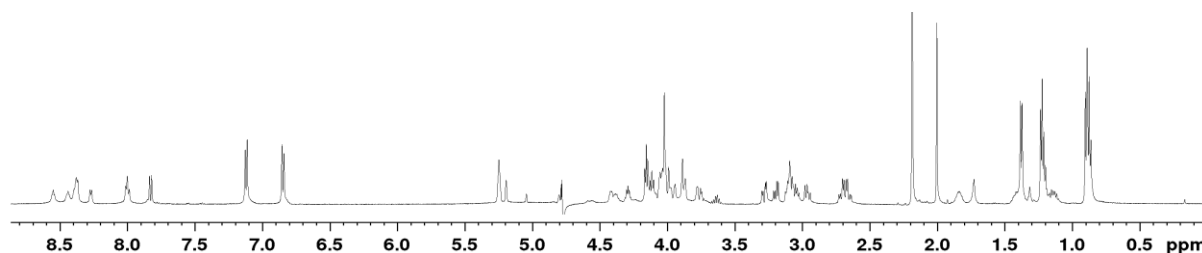
HR-MS (ESI): für C₅₉H₉₉N₁₇O₂₄S₃H₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 763.8178, gef.: 763.8193.

Synthese des Peptids P48 - Glycocin F (RbS¹⁸)¹²⁻²¹



Das Peptid **P48** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet. Im Anschluss an die Gefriertrocknung wurde eine Oxidation der Cysteine zum entsprechenden Disulfid durchgeführt. Dafür wurde das Peptid in Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (pH = 8.7) suspendiert ($c_{\text{Peptid}} \sim 0.5 \text{ mM}$) und unter HPLC Kontrolle im geöffneten Kolben mit Luftsauerstoff für 2-3 Tage intramolekular zum Cystin oxidiert. Nach erneuter Gefriertrocknung und Aufreinigung des Rohprodukts mittels semi-präparativer HPLC, konnte das zyklisierte Peptid erhalten werden.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

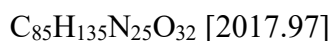
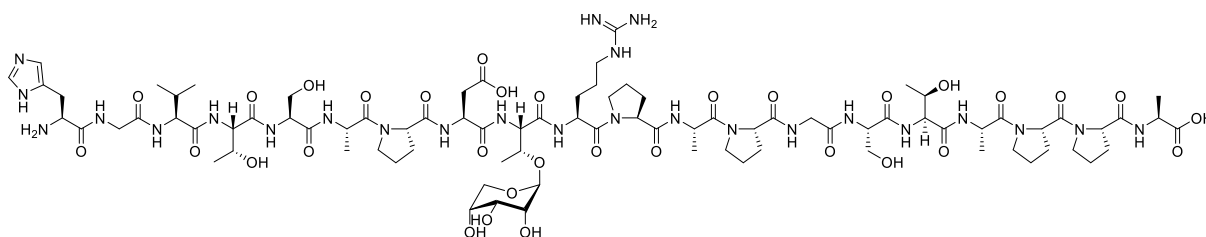
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|---|--|
| 12 | Cys | n.n | 4.71 | 3.28, 3.09 | | |
| 13 | Gly | 8.55 | 4.02 | | | |
| 14 | Ala | 8.39 | 4.38 | 1.38 | | |
| 15 | Gly | 8.44 | 3.96, 3.77 | | | |
| 16 | Tyr | 8.01 | 4.55 | 3.12, 2.96 | 2,6-H 3,5-H | 7.12 6.85 |
| 17 | Asp | 8.27 | 4.66 | 2.71, 2.66 | | |
| 18 | RbS | 8.37 | 4.59 | 4.16, 3.88 | 1-CH 2-CH 3-CH 4-CH 5-CH ₂ | 5.04 5.19 5.24 5.25 3.99, 3.87 |
| 19 | Gly | 8.56 | 4.05 | | | |
| 20 | Thr | 7.99 | 4.42 | 4.29 | H γ | 1.23 |
| 21 | Cys | 8.38 | 4.16 | 3.20, 3.07 | | |
| 22 | Ile | 7.83 | 4.12 | 1.84 | H γ H δ | 1.42, 1.14, 0.90 0.88 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 10-70 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 5.69 min, 10-70 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 96 %.

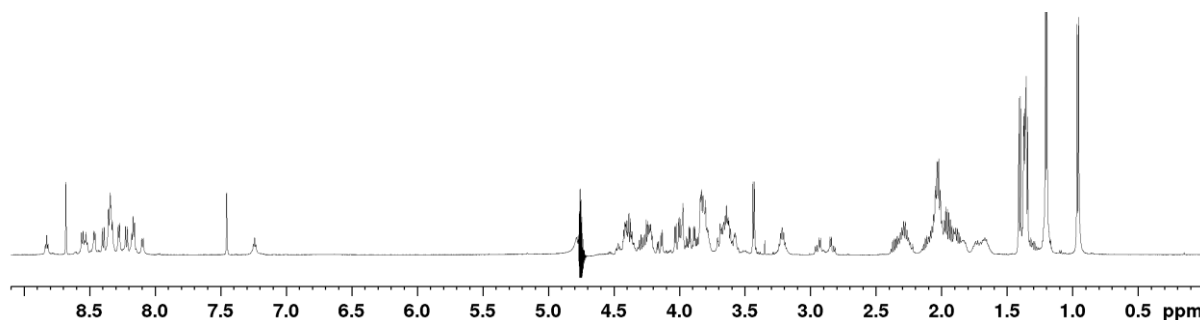
HR-MS (ESI): für C₄₆H₆₈N₁₁O₂₁S₂ [M-H]⁻, ber.: 1174.4038, gef.: 1174.4046.

Synthese des Peptids P49 - Mucin I (RbT¹⁴⁴)¹³⁶⁻¹⁵⁵



Das Peptid **P49** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7)/D₂O 9:1))



| Position | Aminosäure | NH | Hα | Hβ | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|--------|------------|
| 136 | His | n.n | 4.38 | 3.43 | 5-H | 7.45 |
| | | | | | 2-H | 8.68 |
| 137 | Gly | 8.83 | 4.15, 4.02 | | | |
| 138 | Val | 8.40 | 4.25 | 2.11 | Hγ | 0.96 |
| 139 | Thr | 8.35 | 4.48 | 4.35 | Hγ | 1.20 |
| 140 | Ser | 8.16 | 4.52 | 3.93, 3.88 | | |
| 141 | Ala | 8.34 | 4.29 | 1.40 | | |
| 142 | Pro | | 4.41 | 2.31, 1.92 | Hγ | 2.03 |
| | | | | | Hδ | 3.82, 3.65 |
| 143 | Asp | 8.56 | 4.71 | 2.94, 2.83 | | |

Experimenteller Teil

| | | | | | | |
|-----|-----|------|------------|------------|-------------------|------------|
| 144 | RbT | 8.22 | 4.36 | 4.23 | H γ | 1.20 |
| | | | | | 1-CH | 4.81 |
| | | | | | 2-CH | 3.58 |
| | | | | | 3-CH | 3.82 |
| | | | | | 4-CH | 3.98 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.70, 3.60 |
| 145 | Arg | 8.10 | 4.61 | 1.84, 1.74 | H γ | 1.67, 1.28 |
| | | | | | H δ | 3.22 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.24 |
| 146 | Pro | | 4.41 | 2.31, 1.92 | H γ | 2.03 |
| | | | | | H δ | 3.82, 3.65 |
| 147 | Ala | 8.46 | 4.59 | 1.37 | | |
| 148 | Pro | | 4.41 | 2.31, 1.92 | H γ | 2.03 |
| | | | | | H δ | 3.82, 3.65 |
| 149 | Gly | 8.53 | 4.00, 3.97 | | | |
| 150 | Ser | 8.33 | 4.46 | 3.84, 3.79 | | |
| 151 | Thr | 8.17 | 4.42 | 4.21 | H γ | 1.35 |
| 152 | Ala | 8.28 | 4.58 | 1.35 | | |
| 153 | Pro | | 4.41 | 2.31, 1.92 | H γ | 2.03 |
| | | | | | H δ | 3.82, 3.65 |
| 154 | Pro | | 4.41 | 2.31, 1.92 | H γ | 2.03 |
| | | | | | H δ | 3.82, 3.65 |
| 155 | Ala | 8.33 | 4.56 | 1.36 | | |

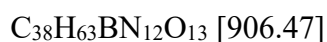
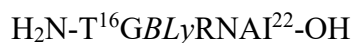
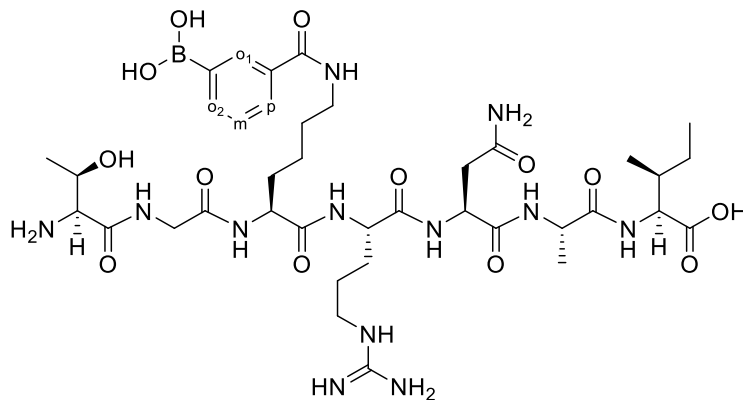
Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 10-30 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 4.69 min, 10-30 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 96 %.

HR-MS (ESI): für C₈₅H₁₃₅N₂₅O₃₂H₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 1010.4939, gef.: 1010.4957.

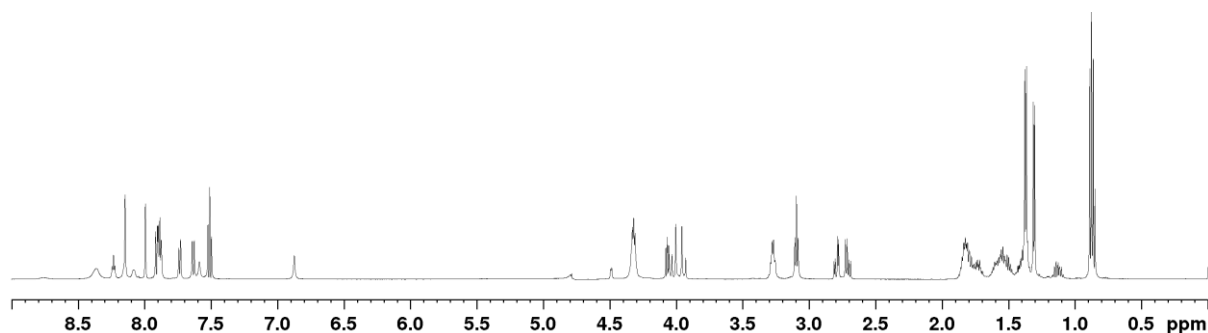
6.12 Einbau von Boronsäuren in Peptide - Terminal im *backbone* oder via Seitenketten-Kupplung

Synthese des Peptids P42 - PKI(BLy)¹⁸¹⁶⁻²²



Das Peptid **P42** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Das Harz wurde nach der finalen Fmoc-Abspaltung am Peptidsynthesizer in eine Umkehrfritte überführt, mit 3-Carboxyphenylboronsäure und je 3 eq HOBt und HBTU, sowie mit 6 eq DIPEA für 2 h gekuppelt. Anschließend wurde je 3x mit DMF, DCM und MeOH gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7.4)/D₂O 9:1))



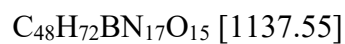
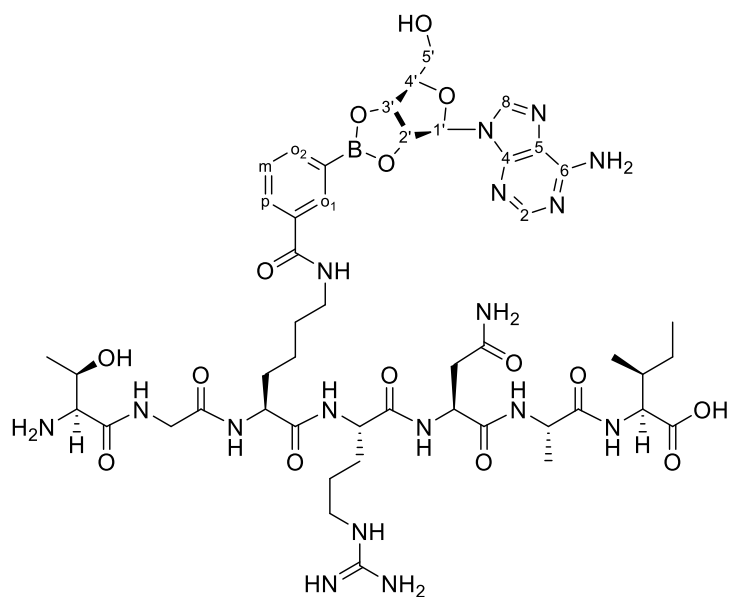
Experimenteller Teil

| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 16 | Thr | n.n. | 4.49 | 4.31 | H γ | 1.31 |
| 17 | Gly | 8.76 | 3.98 | | | |
| 18 | BLy | 8.08 | 4.32 | 1.81 | H γ | 1.38 |
| | | | | | H δ | 1.51 |
| | | | | | H ϵ | 3.27 |
| | | | | | ϵ NH | 8.23 |
| | | | | | B-o1 | 8.18, 8.00 |
| | | | | | B-o2 | 7.90 |
| | | | | | B-p | 7.74 |
| | | | | | B-m | 7.51 |
| 19 | Arg | 8.37 | 4.32 | 1.74 | H γ | 1.60 |
| | | | | | H δ | 3.10 |
| | | | | | NH(Guan.) | - |
| 20 | Asn | 8.35 | 4.65 | 2.80, 2.71 | NH ₂ | 7.59, 6.87 |
| 21 | Ala | 8.36 | 4.34 | 1.37 | | |
| 22 | Ile | 7.64 | 4.06 | 1.86 | H γ -CH ₃ | 0.88 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.42, 1.13 |
| | | | | | H δ | 0.86 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 15-30 % B in 30 min, 15 mL/min.

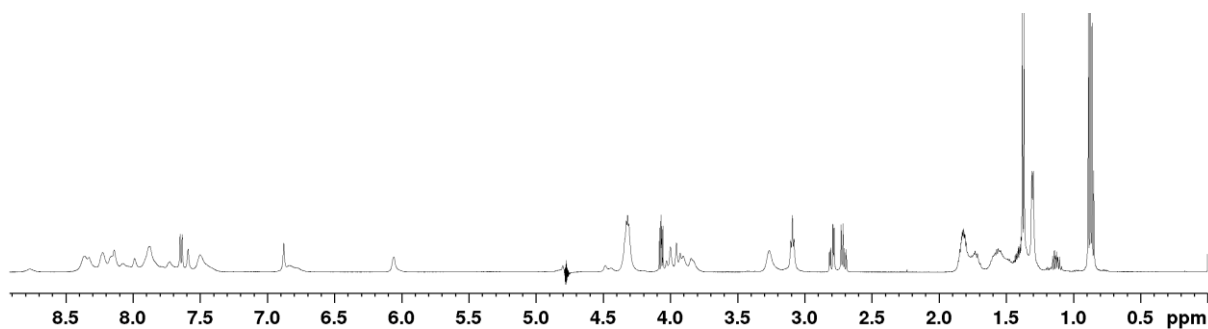
HPLC: t_R = 6.02 min, 15-30 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 98 %.

Boronsäureveresterung des Peptids P44 - PKI(BLy¹⁸)¹⁶⁻²² mit Adenosin



Das Heptapeptid TGBLyRNAI (**P42**, 2.00 mg, 1.96 μ mol, 1.00 eq) und Adenosin (0.52 mg, 1.96 μ mol, 1.00 eq) wurden in 0.60 mL 20 mM Phosphatpuffer (pH 7.4) und D₂O in einem Verhältnis von 9:1 gelöst und nach 12 h NMR-spektroskopisch vermessen.

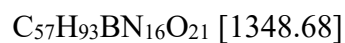
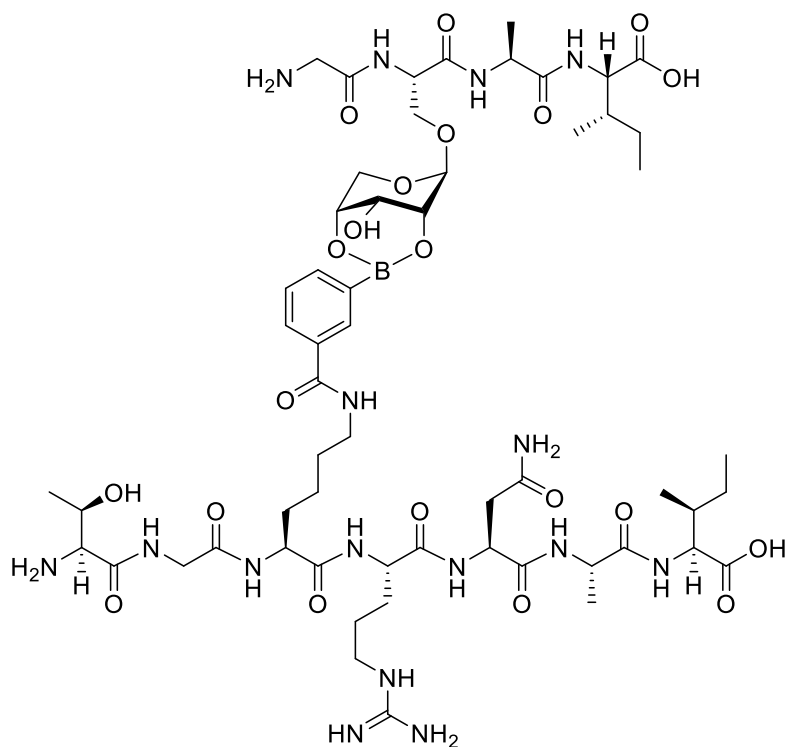
(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7.4)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

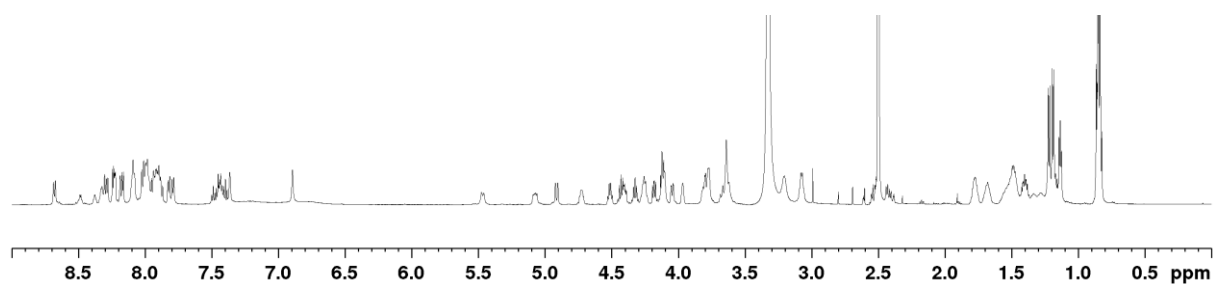
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 16 | Thr | n.n. | 4.48 | 4.32 | H γ | 1.31 |
| 17 | Gly | 8.77 | 3.98 | | | |
| 18 | BLy | 8.08 | 4.31 | 1.80 | H γ | 1.38 |
| | | | | | H δ | 1.48 |
| | | | | | H ϵ | 3.26 |
| | | | | | ϵ NH | 8.23 |
| | | | | | B-o1 | 8.14, 7.99 |
| | | | | | B-o2 | 7.88 |
| | | | | | B-p | 7.73 |
| | | | | | B-m | 7.50 |
| | Adenosin | | | | 1'-CH | 6.06 |
| | | | | | 2'-CH | 4.44 |
| | | | | | 3'-CH | 4.31 |
| | | | | | 4'-CH | 4.32 |
| | | | | | 5'-CH ₂ | 3.87 |
| | | | | | 2-CH | 8.19 |
| | | | | | 8-CH | 8.27 |
| 19 | Arg | 8.33 | 4.33 | 1.82, 1.73 | H γ | 1.57 |
| | | | | | H δ | 3.09 |
| | | | | | NH(Guan.) | - |
| 20 | Asn | 8.36 | 4.67 | 2.80, 2.71 | NH ₂ | 7.59, 6.88 |
| 21 | Ala | 8.16 | 4.35 | 1.37 | | |
| 22 | Ile | 7.64 | 4.07 | 1.83 | H γ -CH ₃ | 0.88 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.41, 1.14 |
| | | | | | H δ | 0.86 |

Synthese des Peptids P45 - PKI(BLy¹⁸)¹⁶⁻²² mit dem Tetrapeptid Gly-RbS-Ala-Ile



Das Heptapeptid TGBLyRNAI (**P42**, 3.06 mg, 3.00 µmol, 1.00 eq) und das Tetrapeptid GRbSAI (**P1**, 1.78 mg, 3.00 µmol, 1.00 eq) wurden in 0.60 mL DMSO_{d6} gelöst und nach 2 h NMR-spektroskopisch vermessen. Die Messung wurde nach 20 h wiederholt, um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten.

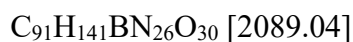
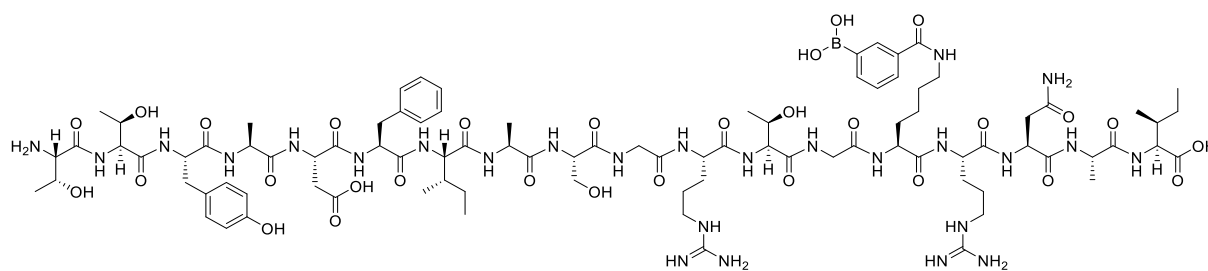
(600 MHz, 300 K, DMSO_{d6})



Experimenteller Teil

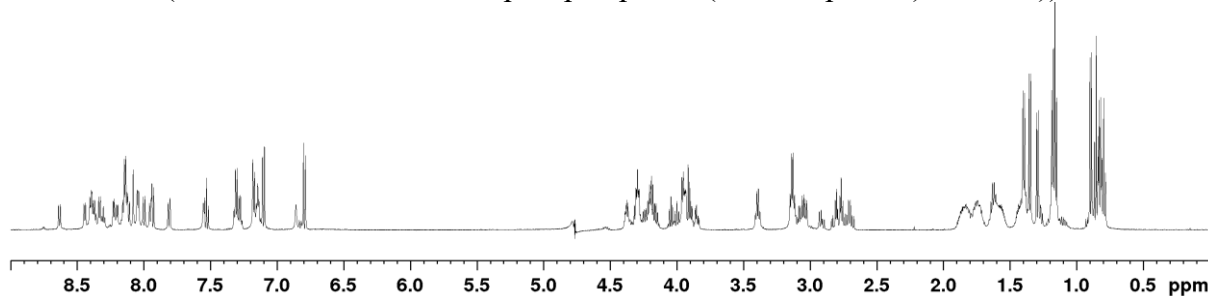
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 16 | Thr | n.n. | 4.40 | 4.11 | H γ | 1.13 |
| | | | | | OH | 5.08 |
| 17 | Gly | 7.99 | 3.64 | | | |
| 18 | BLy | 7.90 | 4.26 | 1.70, 1.57 | H γ | 1.33, 1.28 |
| | | | | | H δ | 1.52 |
| | | | | | H ϵ | 3.21 |
| | | | | | ϵ NH | 8.49, 8.38 |
| | | | | | B-o1 | 8.31, 8.22 |
| | | | | | B-o2 | 7.91 |
| | | | | | B-p | 7.81 |
| | | | | | B-m | 7.45 |
| 19 | Arg | 8.08 | 4.26 | 1.67, 1.54 | H γ | 1.49 |
| | | | | | H δ | 3.08 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.43 |
| 20 | Asn | 8.10 | 4.51 | 2.53, 2.42 | NH ₂ | 7.37, 6.90 |
| 21 | Ala | 7.79 | 4.33 | 1.19 | | |
| 22 | Ile | 7.93 | 4.13 | 1.77 | H γ -CH ₃ | 0.85 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.40, 1.15 |
| | | | | | H δ | 0.83 |
| | | | | | COOH | 12.53 |
| | Gly | 8.33 | 3.77 | | | |
| | RbS | 8.68 | 4.73 | 3.79, 3.63 | 1-CH | 4.91 |
| | | | | | 2-CH | 4.05 |
| | | | | | 3-CH | 3.97 |
| | | | | | 4-CH | 4.12 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.81, 3.66 |
| | | | | | 3-OH | 5.47 |
| | Ala | 8.29 | 4.43 | 1.22 | | |
| | Ile | 8.02 | 4.18 | 1.80 | H γ -CH ₃ | 0.86 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.40, 1.18 |
| | | | | | H δ | 0.85 |

Synthese des Peptids **P32** - PKI(BLy¹⁸)⁵⁻²²



Das Peptid **P32** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Die finale Fmoc-Abspaltung am Peptidsynthesizer wurde ausgelassen und das Harz in eine Umkehrfritte überführt. Zur Dde-Entschützung des Seitenketten-Amins des Lysins wurde das Harz zweimal 30 min mit 2 %iger Hydrazin-Lösung in DMF behandelt und je 3x mit DMF, DCM und MeOH gewaschen. Anschließend erfolgte die Kupplung der 3-Carboxyphenylboronsäure (3 eq) mit je 3 eq HOBt und HBTU, sowie mit 6 eq DIPEA für 2 h. Nach Waschen des Harzes (je 3x DMF, DCM, MeOH) wurde die Fmoc-Schutzgruppe des *N*-Terminus entfernt. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 3.0)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

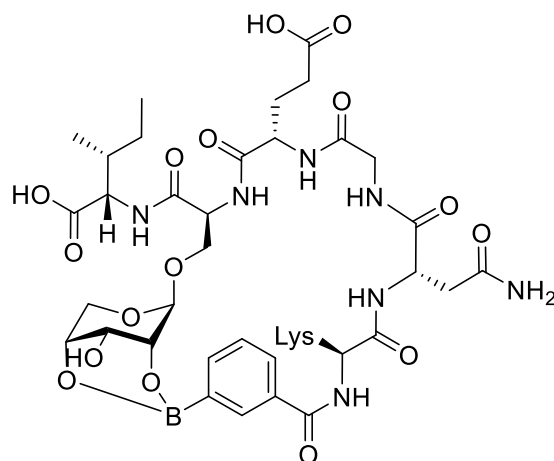
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|---------------|---|--|
| 5 | Thr | n.n. | 4.05 | 3.91 | H γ | 1.16 |
| 6 | Thr | 8.63 | 4.22 | 4.16 | H γ | 1.17 |
| 7 | Tyr | 8.45 | 4.52 | 3.04, 2.91 | 2,6-H 3,5-H | 7.10 6.80 |
| 8 | Ala | 8.23 | 4.19 | 1.29 | | |
| 9 | Asp | 8.13 | 4.58 | 2.82, 2.75 | | |
| 10 | Phe | 8.04 | 4.54 | 3.09 | 2,6-H 3,5-H 4-H | 7.32 7.18 7.28 |
| 11 | Ile | 7.95 | 4.00 | 1.76 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.83 1.36, 1.10 0.80 |
| 12 | Ala | 8.20 | 4.24 | 1.40 | | |
| 13 | Ser | 8.15 | 4.39 | 3.90, 3.85 | | |
| 14 | Gly | 8.31 | 3.96 | | | |
| 15 | Arg | 8.16 | 4.35 | 1.84, 1.73 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.64 3.14 7.15 |
| 16 | Thr | 8.12 | 4.37 | 4.29 | H γ | 1.18 |
| 17 | Gly | 8.37 | 3.94 | | | |
| 18 | BLy | 8.05 | 4.29 | 1.82, 1.76 | H γ H δ H ϵ ϵ NH B-o1 B-o2 B-p B-m | 1.45 1.57 3.40 8.39 8.08 7.93 7.81 7.53 |
| 19 | Arg | 8.40 | 4.31 | 1.84, 1.73 | H γ H δ NH(Guan.) | 1.64 3.14 7.15 |
| 20 | Asn | 8.33 | 4.64 | 2.79, 2.69 | NH ₂ | 7.55, 6.86 |
| 21 | Ala | 8.14 | 4.27 | 1.35 | | |
| 22 | Ile | 8.00 | 4.19 | 1.89 | H γ -CH ₃ H γ -CH ₂ H δ | 0.89 1.41, 1.19 0.85 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 20-40 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 5.03 min, 20-40 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 98 %.

HR-MS (ESI): für C₉₁H₁₄₁BN₂₆O₃₀H₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 1046.0291, gef.: 1046.0290.

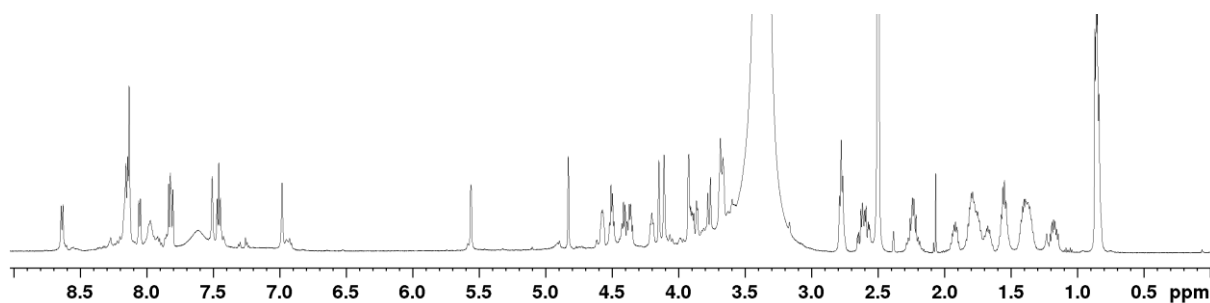
Synthese des Peptids P50



3CB-KNGERbsI-OH

C₃₈H₅₆BN₈O₁₆ [890.38]

Das Peptid **P50** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Das Harz sowie die 3-Carboxyphenylboronsäure (3CB) wurden nach der finalen Fmoc-Abspaltung am Peptidsynthesizer in eine Umkehrfritte überführt, mit je 3 eq HOBT und HBTU, sowie mit 6 eq DIPEA für 2 h gekuppelt und anschließend je 3x mit DMF, DCM und MeOH gewaschen. Zuletzt wurde die OAc-Abspaltung durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt und mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, DMSO_{d6})

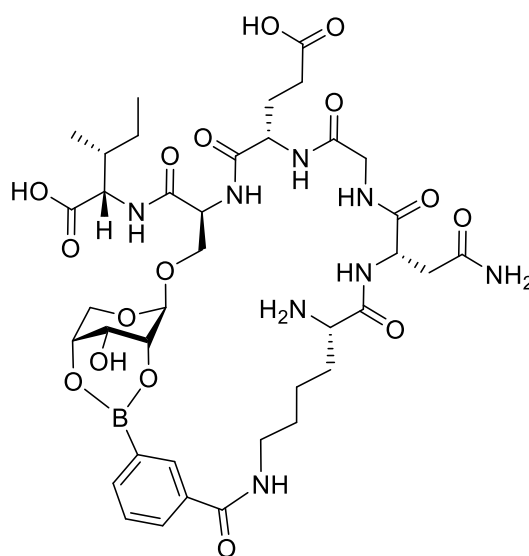
Experimenteller Teil

| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|---------------------|------------|
| 15 | 3CB | - | - | - | B-o1 | 8.13 |
| | | | | | B-o2 | 7.83 |
| | | | | | B-p | 7.81 |
| | | | | | B-m | 7.46 |
| 16 | Lys | 8.64 | 4.37 | 1.75, 1.68 | H γ | 1.37 |
| | | | | | H δ | 1.56 |
| | | | | | H ϵ | 2.78 |
| | | | | | NH $_3^+$ | 7.61 |
| 17 | Asn | 8.05 | 4.50 | 2.64, 2.58 | NH $_2$ | 7.51, 6.98 |
| 18 | Gly | 8.13 | 3.88, 3.68 | | | |
| 19 | Glu | 8.15 | 4.41 | 1.93, 1.82 | H γ | 2.24 |
| 20 | RbS | 8.16 | 4.57 | 3.90, 3.67 | 1-H | 4.83 |
| | | | | | 2-H | 4.15 |
| | | | | | 3-H | 3.92 |
| | | | | | 3-OH | 5.56 |
| | | | | | 4-H | 4.11 |
| | | | | | 5-H | 3.77, 3.68 |
| 21 | Ile | 7.98 | 4.20 | 1.79 | H γ -CH $_3$ | 0.86 |
| | | | | | H γ -CH $_2$ | 1.41, 1.18 |
| | | | | | H δ | 0.85 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 30-90 % B in 30 min, 15 mL/min.

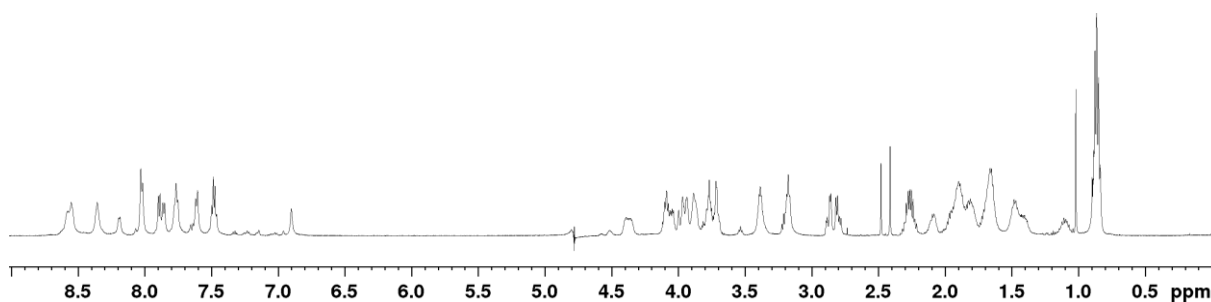
HPLC: t_R = 3.91 min, 10-70 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 99 %.

HR-MS (ESI): für C $_{38}$ H $_{56}$ BN $_8$ O $_{16}$ H $^+$ [M+H] $^+$, ber.: 891.3909, gef.: 891.3920.

Synthese des Peptids **P51**

Das Peptid **P51** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Die finale Fmoc-Abspaltung am Peptidsynthesizer wurde ausgelassen und das Harz in eine Umkehrfritte überführt. Zur Dde-Entschützung des Seitenketten-Amins des Lysins wurde das Harz zweimal 30 min mit 2 %iger Hydrazin-Lösung in DMF behandelt und je 3x mit DMF, DCM und MeOH gewaschen. Anschließend erfolgte die Kupplung der 3-Carboxyphenylboronsäure (3 eq) mit je 3 eq HOBt und HBTU, sowie mit 6 eq DIPEA für 2 h. Nach Waschen des Harzes (je 3x DMF, DCM, MeOH) wurde zunächst die Fmoc-Schutzgruppe des *N*-Terminus und zuletzt die OAc-Schutzgruppen durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) entfernt und mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7.4)/D₂O 9:1))



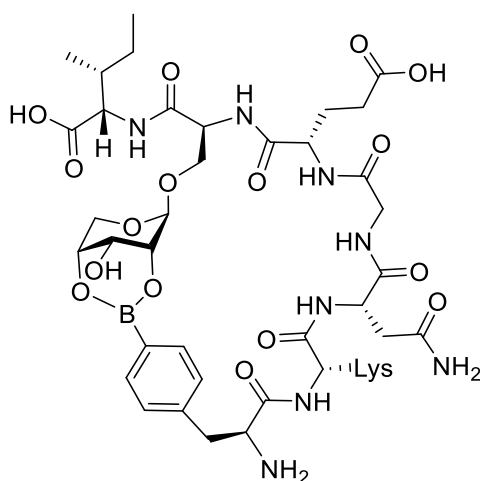
Experimenteller Teil

| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-----------------------------|------------|
| 15 | Arg | 8.36 | 4.41 | 1.89, 1.65 | H γ | 1.50 |
| | | | | | H δ | 3.39 |
| 18 | Bly | 8.56 | 4.52 | 1.90 | H γ | 1.46 |
| | | | | | H δ | 1.72 |
| | | | | | H ϵ | 3.18 |
| | | | | | ϵ NH | - |
| | | | | | B-o1 | 7.88 |
| | | | | | B-o2 | 8.02 |
| | | | | | B-p | 7.77 |
| 17 | Asn | 8.58 | 4.38 | 2.87, 2.80 | B-m | 7.48 |
| | | | | | NH ₂ | 7.61, 6.90 |
| 18 | Gly | 8.35 | 3.98, 3.91 | | | |
| 19 | Glu | 8.19 | 4.35 | 2.09, 1.96 | H γ | 2.27 |
| 20 | RbS | 8.55 | 4.58 | 4.05, 3.71 | 1-H | n.n. |
| | | | | | 2-H | 3.72 |
| | | | | | 3-H | 3.93 |
| | | | | | 4-H | 3.87 |
| | | | | | 5-H | 3.79, 3.72 |
| 21 | Ile | 7.62 | 4.09 | 1.80 | H γ -CH ₃ | 0.87 |
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.40, 1.11 |
| | | | | | H δ | 0.85 |

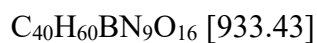
Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 5-50 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 6.30 min, 5-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

HR-MS (ESI): für C₄₄H₆₇BN₁₂O₁₇H⁺ [M+H]⁺, ber.: 566.7455, gef.: 566.7462.

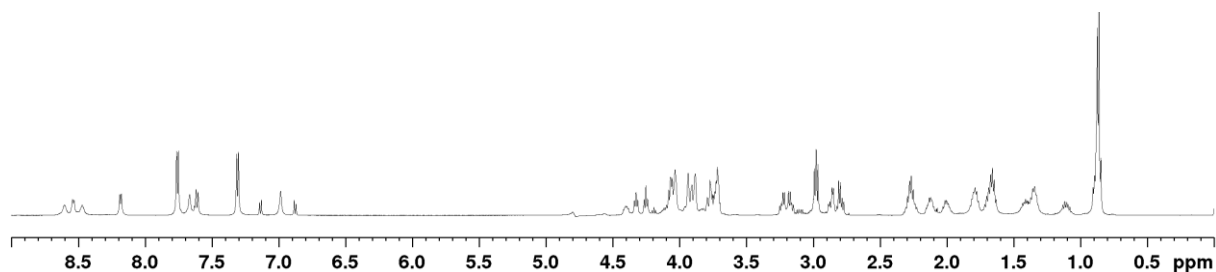
Synthese des Peptids **P52**

Bpa-KNGERbSI-OH



Das Peptid **P52** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Das Harz sowie das 4-Borono-Phenylalanin wurden nach der finalen Fmoc-Abspaltung am Peptidsynthesizer in eine Umkehrfritte überführt, mit je 3 eq HOBt und HBTU, sowie mit 6 eq DIPEA für 2 h gekuppelt und anschließend je 3x mit DMF, DCM und MeOH gewaschen. Zuletzt wurde die Fmoc-Schutzgruppe entfernt, sowie die OAc-Abspaltung durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt und mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7.4)/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

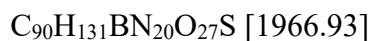
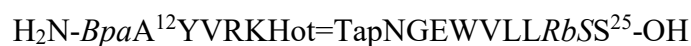
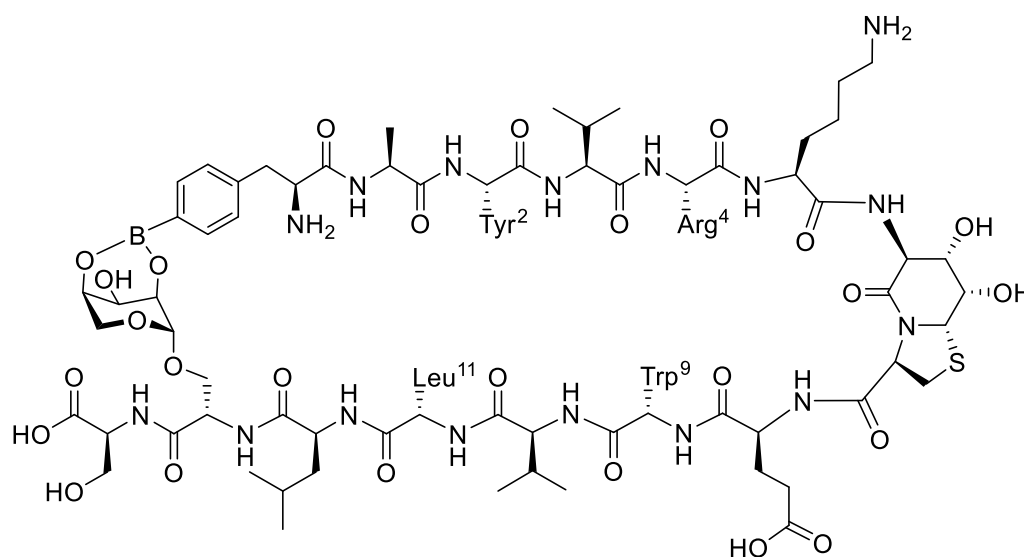
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|---------------------|------------|
| 15 | Bpa | n.n. | 4.25 | 3.23, 3.16 | 2,6-H | 7.31 |
| | | | | | 3,5-H | 7.76 |
| 16 | Lys | 8.17 | 4.32 | 1.77, 1.70 | H γ | 1.34 |
| | | | | | H δ | 1.65 |
| | | | | | H ϵ | 2.98 |
| | | | | | NH $_3^+$ | n.n. |
| 17 | Asn | 8.60 | 4.61 | 2.87, 2.79 | NH $_2$ | 7.67, 6.98 |
| 18 | Gly | 8.47 | 4.05, 3.90 | | | |
| 19 | Glu | 8.18 | 4.40 | 2.13, 2.00 | H γ | 2.26 |
| 20 | RbS | 8.54 | 4.56 | 4.03, 3.75 | 1-H | n.n. |
| | | | | | 2-H | 3.71 |
| | | | | | 3-H | 3.93 |
| | | | | | 4-H | 3.88 |
| | | | | | 5-H | 3.78, 3.71 |
| 21 | Ile | 7.61 | 4.07 | 1.80 | H γ -CH $_3$ | 0.87 |
| | | | | | H γ -CH $_2$ | 1.41, 1.10 |
| | | | | | H δ | 0.86 |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18, 5 μ m, 5-35 % B in 30 min, 15 mL/min.*

HPLC: $t_R = 5.53$ min, 5-35 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 94 %.

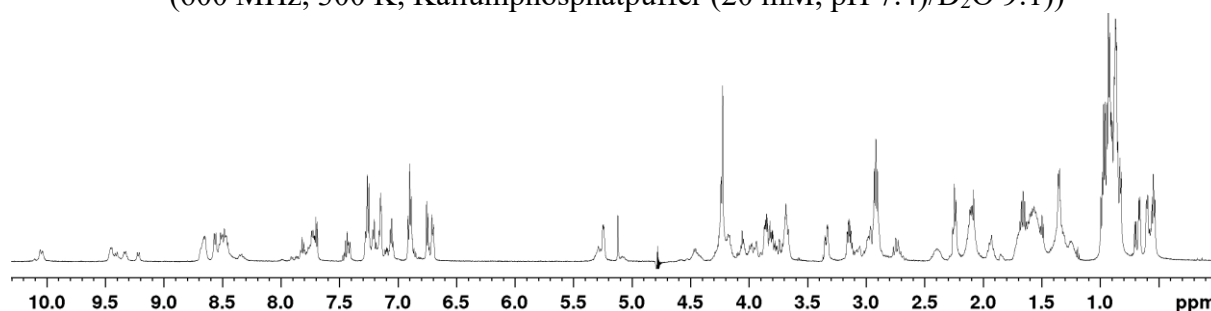
HR-MS (ESI): für C $_{40}$ H $_{60}$ BN $_9$ O $_{16}$ H $^+$ [M+H] $^+$, ber.: 934.4331, gef.: 934.4330.

Synthese des Peptids **P53** - Foldon- β -Hairpin (**Bpa**¹¹, **Hot**¹⁷=**Tap**¹⁸, **RbS**²⁴)¹²⁻²⁵



Das Peptid **P53** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde die OAc-Abspaltung manuell in einer Umkehrfritte durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt. Anschließend wurde mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7.4)/D₂O 9:1))



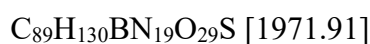
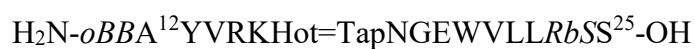
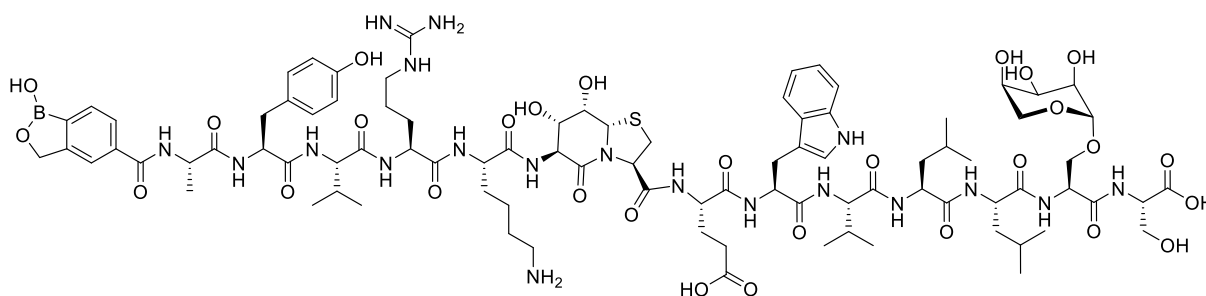
Experimenteller Teil

| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-------------------|------------|
| 11 | Bpa | | 5.08 | 3.07, 2.97 | 2,6-H | 7.70 |
| | | | | | 3,5-H | 7.26 |
| 12 | Ala | 8.46 | 4.58 | 1.35 | | |
| 13 | Tyr | 8.34 | 5.28 | 2.90, 2.73 | 2,6-H | 6.90 |
| | | | | | 3,5-H | 6.72 |
| 14 | Val | 9.33 | 4.72 | 2.11 | H γ | 0.98, 0.91 |
| 15 | Arg | 8.66 | 4.19 | 1.60 | H γ | 0.89 |
| | | | | | H δ | 2.39, 2.12 |
| | | | | | NH(Guan.) | 7.15 |
| 16 | Lys | 8.56 | 4.46 | 1.66 | H γ | 1.38, 1.25 |
| | | | | | H δ | 1.71, 1.56 |
| | | | | | H ϵ | 2.91 |
| 17 | Hot | n.n. | | | 6-H | 3.68 |
| | | | | | 7-H | 4.22 |
| | | | | | 8-H | 4.23 |
| | | | | | 8a-H | 5.12 |
| 18 | Tap | | | | 3-H | 5.24 |
| | | | | | 2-H | 3.34, 3.14 |
| 19 | Glu | 7.73 | 4.67 | 2.08, 1.93 | H γ | 2.24 |
| 20 | Trp | 8.66 | 5.07 | 2.98, 2.92 | 2-H | 7.15 |
| | | | | | 4-H | 7.21 |
| | | | | | 5-H | 7.05 |
| | | | | | 6-H | 7.20 |
| | | | | | 7-H | 7.43 |
| | | | | | NH ϵ | 10.05 |
| 21 | Val | 9.45 | 4.60 | 2.13 | H γ | 0.94, 0.86 |
| 22 | Leu | 8.47 | 4.22 | 1.65, 1.36 | H γ | 1.59 |
| | | | | | H δ | 0.68, 0.57 |
| 23 | Leu | 8.51 | 4.46 | 1.58 | H γ | 1.49 |
| | | | | | H δ | 0.86, 0.82 |
| 24 | RbS | 8.68 | 4.53 | 3.99, 3.68 | 1-CH | n.n. |
| | | | | | 2-CH | 3.67 |
| | | | | | 3-CH | 4.05 |
| | | | | | 4-CH | 3.94 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.86, 3.79 |
| 25 | Ser | 7.81 | 4.29 | 3.84, 3.69 | | |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18, 5 μ m, 15-50 % B in 30 min, 15 mL/min.*

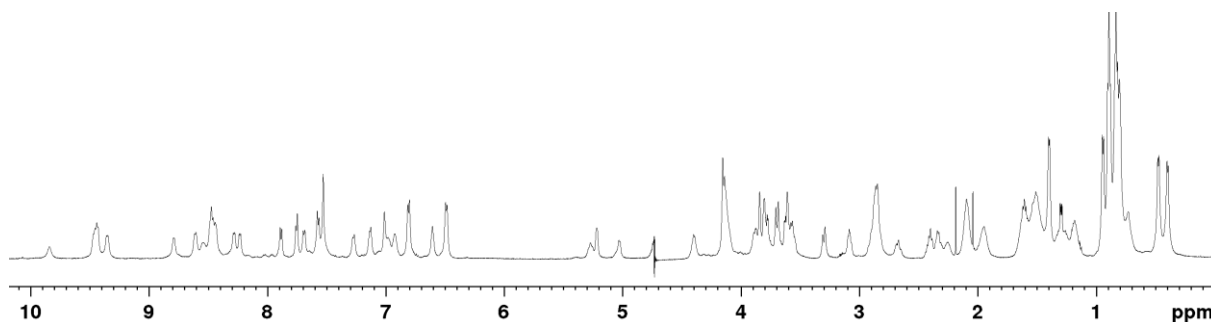
HPLC: $t_R = 4.70$ min, 15-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 90 %.

HR-MS (ESI): für C₉₀H₁₃₁BN₂₀O₂₇SH₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 984.9745, gef.: 984.9747.

Synthese des Peptids **P54** - Foldon- β -Hairpin (*oBB*¹¹, Hot¹⁷=Tap¹⁸, RbS²⁴)¹²⁻²⁵

Das Peptid **P54** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Nach der finalen Fmoc-Abspaltung wurde das 4-Carboxybenzoboroxol (3 eq) manuell unter Zugabe von je 3 eq HOBt und HBTU, sowie 6 eq DIPEA für 2 h in einer Umkehrfritte an das Peptid gekuppelt. Nach Waschen des Harzes (je 3x DMF, DCM, MeOH) wurde das Peptid mit Abspalllösung B für 3 h vom Harz abgespalten.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7.0)/D₂O 9:1))



| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|------------------|------------|
| 11 | <i>oBB</i> | | | | B-o | 7.53 |
| | | | | | B-m ₁ | 7.57 |
| | | | | | B-m ₂ | 7.75 |
| | | | | | CH ₂ | 5.21 |
| 12 | Ala | 8.28 | 4.40 | 1.40 | | |
| 13 | Tyr | 8.54 | 5.27 | 2.90, 2.68 | 2,6-H | 6.81 |
| | | | | | 3,5-H | 6.49 |
| 14 | Val | 9.35 | 4.71 | 2.08 | H γ | 0.94, 0.90 |
| 15 | Arg | 8.45 | 4.14 | 1.26 | H γ | 1.15, 0.73 |
| | | | | | H δ | 2.40, 2.25 |

Experimenteller Teil

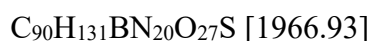
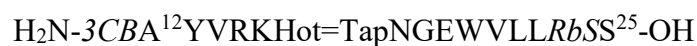
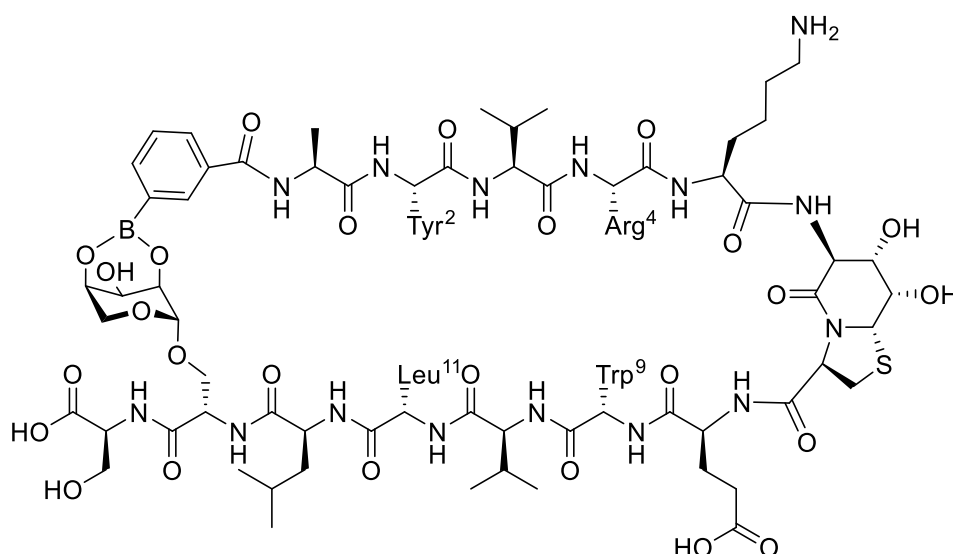
| | | | | | | |
|----|-----|------|------|------------|-------------------|------------|
| 16 | Lys | 8.79 | 4.44 | 1.63 | H γ | 1.16, 0.89 |
| | | | | | H δ | 1.59, 1.48 |
| | | | | | H ϵ | 2.85 |
| 17 | Hot | n.n. | | | 6-H | 3.60 |
| | | | | | 7-H | 4.13 |
| | | | | | 8-H | 4.15 |
| | | | | | 8a-H | 5.22 |
| 18 | Tap | | | | 3-H | 5.29 |
| | | | | | 2-H | 3.30, 3.09 |
| 19 | Glu | 7.69 | 4.67 | 2.08, 1.95 | H γ | 2.33 |
| 20 | Trp | 8.61 | 5.03 | 2.89, 2.82 | 2-H | 7.01 |
| | | | | | 4-H | 6.98 |
| | | | | | 5-H | 6.93 |
| | | | | | 6-H | 7.13 |
| | | | | | 7-H | 7.27 |
| | | | | | NH ϵ | 9.84 |
| 21 | Val | 9.44 | 4.59 | 2.11 | H γ | 0.88, 0.84 |
| 22 | Leu | 8.44 | 4.15 | 1.33, 1.20 | H γ | 1.30 |
| | | | | | H δ | 0.47, 0.40 |
| 23 | Leu | 8.48 | 4.38 | 1.54 | H γ | 1.52 |
| | | | | | H δ | 0.83, 0.80 |
| 24 | RbS | 8.23 | 4.42 | 3.78, 3.61 | 1-CH | 4.60 |
| | | | | | 2-CH | 3.61 |
| | | | | | 3-CH | 3.84 |
| | | | | | 4-CH | 3.80 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.70, 3.57 |
| 25 | Ser | 7.89 | 4.17 | 3.88, 3.79 | | |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 5-50 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 5.46 min, 15-50 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

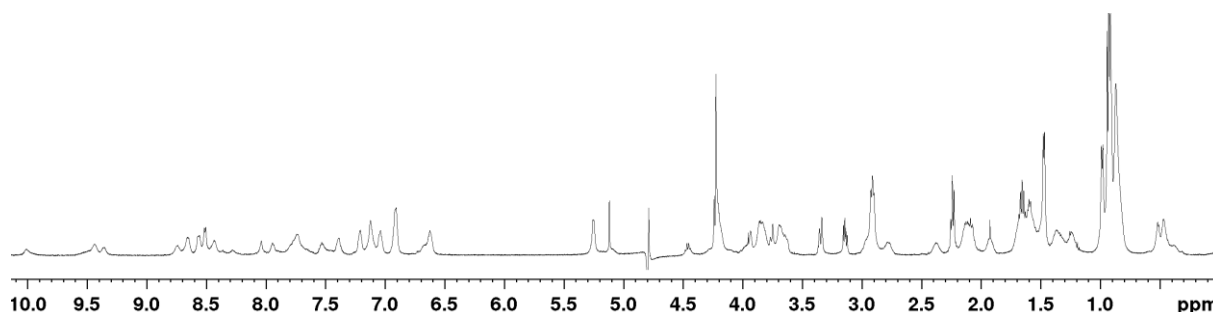
HR-MS (ESI): für C₈₉H₁₃₀BN₁₉O₂₉SH₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 986.9627, gef.: 986.9635.

Synthese des Peptids **P55** - Foldon- β -Hairpin (**3CB**¹¹, **Hot**¹⁷=**Tap**¹⁸, **RbS**²⁴)¹²⁻²⁵



Das Peptid **P55** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Das Harz sowie die 3-Carboxyphenylboronsäure (**3CB**) wurden nach der finalen Fmoc-Abspaltung am Peptidsynthesizer in eine Umkehrfritte überführt, mit je 3 eq HOBt und HBTU, sowie mit 6 eq DIPEA für 2 h gekuppelt und anschließend je 3x mit DMF, DCM und MeOH gewaschen. Zuletzt wurde die OAc-Abspaltung durch zweimalige Zugabe von 2 %iger NaOMe-Lösung in MeOH (je 30 min) durchgeführt und mit Wasser, Et₂O, DMF (3x) und DCM (6x) gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7.0/D₂O 9:1))



Experimenteller Teil

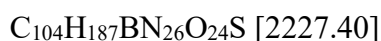
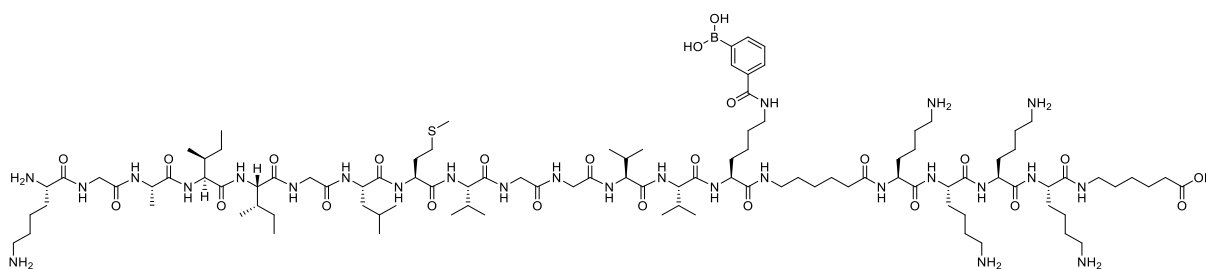
| Position | Aminosäure | NH | H α | H β | andere | |
|----------|------------|------|------------|------------|-------------------|------------|
| 11 | 3CB | - | - | - | B-o1 | 8.04 |
| | | | | | B-o2 | 7.75 |
| | | | | | B-p | 7.52 |
| | | | | | B-m | 7.39 |
| 12 | Ala | 8.51 | 4.46 | 1.47 | | |
| 13 | Tyr | 8.57 | 5.25 | 2.92, 2.77 | 2,6-H | 6.91 |
| | | | | | 3,5-H | 6.62 |
| 14 | Val | 9.36 | 4.76 | 2.10 | H γ | 0.98, 0.94 |
| 15 | Arg | 8.65 | 4.19 | 1.59 | H γ | 0.89 |
| | | | | | H δ | 2.38, 2.13 |
| 16 | Lys | 8.52 | 4.45 | 1.66 | H γ | 1.35, 1.24 |
| | | | | | H δ | 1.69, 1.56 |
| | | | | | H ϵ | 2.91 |
| 17 | Hot | n.n. | | | 6-H | 3.70 |
| | | | | | 7-H | 4.22 |
| | | | | | 8-H | 4.24 |
| | | | | | 8a-H | 5.12 |
| 18 | Tap | | | | 3-H | 5.26 |
| | | | | | 2-H | 3.35, 3.14 |
| 19 | Glu | 7.94 | 4.69 | 2.08, 1.93 | H γ | 2.24 |
| 20 | Trp | 8.74 | 5.09 | 2.96, 2.88 | 2-H | 7.12 |
| | | | | | 4-H | 7.21 |
| | | | | | 5-H | 7.04 |
| | | | | | 6-H | 7.20 |
| | | | | | 7-H | 7.39 |
| | | | | | NH ϵ | 10.01 |
| 21 | Val | 9.44 | 4.73 | 2.12 | H γ | 0.93, 0.89 |
| 22 | Leu | 8.56 | 4.22 | 1.66, 1.38 | H γ | 1.57 |
| | | | | | H δ | 0.51, 0.46 |
| 23 | Leu | 8.67 | 4.30 | 1.59 | H γ | 1.49 |
| | | | | | H δ | 0.87, 0.84 |
| 24 | RbS | 8.45 | 4.61 | 3.84, 3.75 | 1-CH | 4.71 |
| | | | | | 2-CH | 3.68 |
| | | | | | 3-CH | 3.93 |
| | | | | | 4-CH | 3.84 |
| | | | | | 5-CH ₂ | 3.74, 3.64 |
| 25 | Ser | 8.04 | 4.25 | 3.96, 3.84 | | |

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μ m, 12-40 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: t_R = 6.86 min, 12-40 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: 92 %.

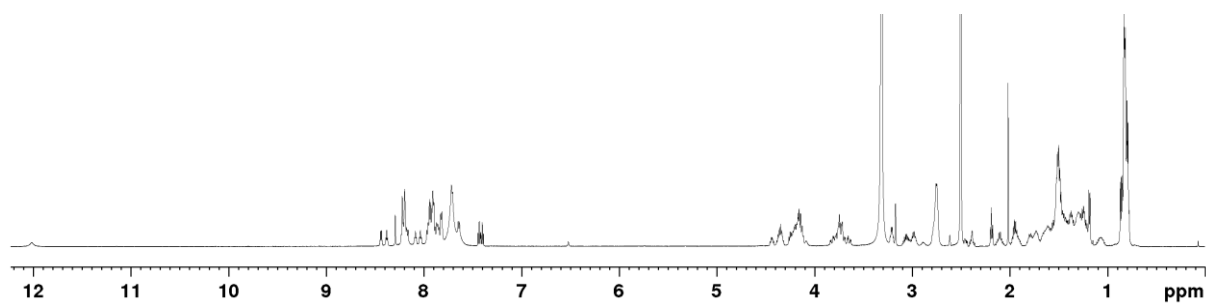
HR-MS (ESI): für C₈₈H₁₂₆BN₁₉O₂₇SH₂²⁺ [M+2H]²⁺, ber.: 962.9522, gef.: 962.9520

Synthese des Peptids P46 - Aβ-Sequenz (BLY⁴¹)²⁸⁻⁴⁰AhxKKKKAhx



Das Peptid **P46** wurde nach der allgemeinen Vorschrift zur automatisierten Peptidsynthese an der Festphase in einem 0.10 mM Maßstab synthetisiert. Die finale Fmoc-Abspaltung am Peptidsynthesizer wurde ausgelassen und das Harz in eine Umkehrfritte überführt. Zur Dde-Entschützung des Seitenketten-Amins des Lysins wurde das Harz zweimal 30 min mit 2 %iger Hydrazin-Lösung in DMF behandelt und je 3x mit DMF, DCM und MeOH gewaschen. Anschließend erfolgte die Kupplung der 3-Carboxyphenylboronsäure (3 eq) mit je 3 eq HOBt und HBTU, sowie mit 6 eq DIPEA für 2 h. Nach Waschen des Harzes (je 3x DMF, DCM, MeOH) wurde die letzte Fmoc-Schutzgruppe entfernt und erneut gewaschen. Für die Abspaltung des Peptids vom Harz wurde für 3 h die Abspatlösung B verwendet.

(600 MHz, 300 K, DMSO_{d6})



| Position | Aminosäure | NH | Hα | Hβ | andere | |
|----------|------------|------|------|------|--------------------|------------|
| 28 | Lys | | 4.11 | | Hγ | 1.30 |
| | | | | | Hδ | 1.49 |
| | | | | | Hε | 2.76 |
| 29 | Gly | 8.22 | 3.68 | | | |
| 30 | Ala | 7.94 | 4.33 | 1.18 | | |
| 31 | Ile | 7.90 | 4.14 | 1.74 | Hγ-CH ₃ | 0.82 |
| | | | | | Hγ-CH ₂ | 1.24, 1.08 |
| | | | | | Hδ | 0.79 |
| 32 | Ile | 7.70 | 4.16 | 1.74 | Hγ-CH ₃ | 0.83 |

Experimenteller Teil

| | | | | | | |
|----|------------------|------|------|------------|-----------------------------|------------|
| | | | | | H γ -CH ₂ | 1.24, 1.08 |
| | | | | | H δ | 0.80 |
| 33 | Gly | 8.21 | 3.70 | | | |
| 34 | Leu | 7.88 | 4.17 | 1.55 | H γ | 1.62 |
| | | | | | H δ | 0.86, 0.80 |
| 35 | Met | 8.17 | 4.36 | 1.90, 1.81 | H γ | 2.46, 2.39 |
| | | | | | SCH ₃ | 2.02 |
| 36 | Val | 7.64 | 4.13 | 1.95 | H γ | 0.83 |
| 37 | Gly | 8.09 | 3.74 | | | |
| 38 | Gly | 8.03 | 3.79 | | | |
| 39 | Val | 7.85 | 4.15 | 1.95 | H γ | 0.82 |
| 40 | Val | 7.91 | 4.25 | 1.95 | H γ | 0.83 |
| 41 | B ₂ U | 8.44 | 4.44 | 1.80 | H γ | 1.44 |
| | | | | | H δ | 1.53 |
| | | | | | H ϵ | 2.76 |
| | | | | | ϵ NH | - |
| | | | | | B-o1 | 8.29, 8.22 |
| | | | | | B-o2 | 7.92 |
| | | | | | B-p | 7.81 |
| | | | | | B-m | 7.43, 7.40 |
| 42 | Ahx | 8.38 | 2.19 | 1.62 | H γ | 1.31 |
| | | | | | H δ | 1.50 |
| | | | | | H ϵ | 3.21 |
| 43 | Lys | 7.96 | 4.20 | 1.74 | H γ | 1.30 |
| | | | | | H δ | 1.49 |
| | | | | | H ϵ | 2.76 |
| | | | | | NH ³⁺ | 7.72 |
| 44 | Lys | 8.19 | 4.20 | 1.74 | H γ | 1.30 |
| | | | | | H δ | 1.49 |
| | | | | | H ϵ | 2.76 |
| | | | | | NH ³⁺ | 7.72 |
| 45 | Lys | 8.19 | 4.20 | 1.74 | H γ | 1.30 |
| | | | | | H δ | 1.49 |
| | | | | | H ϵ | 2.76 |
| | | | | | NH ³⁺ | 7.72 |
| 46 | Lys | 8.19 | 4.20 | 1.74 | H γ | 1.30 |
| | | | | | H δ | 1.49 |
| | | | | | H ϵ | 2.76 |
| | | | | | NH ³⁺ | 7.72 |
| 47 | Ahx | 7.82 | 2.10 | 1.48 | H γ | 1.24 |
| | | | | | H δ | 1.37 |
| | | | | | H ϵ | 3.06 |
| | | | | | COOH | 12.02 |

Experimenteller Teil

Semipräp-HPLC: *Macherey Nagel Nucleodur, C18*, 5 μm , 23-40 % B in 30 min, 15 mL/min.

HPLC: $t_{\text{R}} = 6.71$ min, 23-40 % B in 8 min, 0.45 mL/min, *ACE UltraCore 2.5, SuperC18*, 150 x 2.1 mm, Reinheit: > 99 %.

HR-MS (ESI): für $\text{C}_{104}\text{H}_{187}\text{BN}_{26}\text{O}_{24}\text{SH}_3^{3+}$ $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$, ber.: 745.4897, gef.: 745.4905.

6.13 Käsekuchen Grundrezept

Mürbeteig:

200 g Mehl

75 g Zucker

75 g Margarine

1 Ei

½ P. Backpulver

Füllung:

125 g Margarine

200 g Zucker

1 P. Vanillezucker + Vanille Puddingpulver

3 Eier

500 g Quark

200 g Schmand/Frischkäse

200 g Sahne (aufgeschlagen)

Die Zutaten für den Knetteig in einer Schüssel geben, mit den Händen durchkneten und in eine Springform drücken. An den Seiten einen etwa 2-3 cm hohen Rand hochziehen.

Für die Füllung Margarine, Zucker, Vanillezucker, Puddingpulver und 3 Eier in einer Schüssel verrühren. Dann den Quark und den Schmand/Frischkäse untermischen. Die süße Sahne steif schlagen und unterheben.

Den Backofen auf 180 °C vorheizen.

Die Füllung auf dem Teig verteilen, glatt streichen und eine Stunde backen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] X. Sun, T. D. James, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 8001-8037.
- [2] C. M. Garrett, R. H. Grisham, *Saunders Coll. Publ.* **1999**, 1-851.
- [3] R. A. Laine, *Glycosciences*, Weinheim, Wiley-VCH Verlag, **1997**, 1-14.
- [4] H.-J. Gabius, H.-C. Siebert, S. André, J. Jiménez-Barbero, H. Rüdiger, *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 740-764.
- [5] A. P. Davis, R. S. Wareham, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1999**, *38*, 2978-2996.
- [6] R. A. Dwek, *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 683-720.
- [7] Y. Aoyama, Y. Tanaka, H. Toi, and H. Ogoshi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 634-635.
- [8] G. Das, A. D. Hamilton, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 3675-3678,.
- [9] U. Neidlein, F. Diederich, *Chem. Commun.* **1996**, *6*, 1493-1494.
- [10] T. O. Cage, G. Lecollinet, A. P. Dominey, T. Velasco, A. P. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *2*, 4093-4096.
- [11] E. Klein, Y. Ferrand, E. K. Auty, A. P. Davis, *Chem. Commun.*, **2007**, *23*, 2390-2392.
- [12] C. Ke, H. Destecroix, M. P. Crump, A. P. Davis, *Nat. Chem.*, **2012**, *4*, 718-723,.
- [13] Y. Liu, X. Wu, C. He, Y. Jiao, C. Duan, *Chem. Commun.*, **2009**, *48*, 7554-7556,.
- [14] P. Wu, Y. He, H. F. Wang, and X. P. Yan, *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 1427-1433.
- [15] D. H. Yang, N. Takahara, S. W. Lee, T. Kunitake, *Sensors Actuators, B Chem.* **2008**, *130*, 379-385.
- [16] V. Janowski, K. Severin, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8521-8523.
- [17] J. P. Lorand, J. O. Edwards, *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 769-774.
- [18] X. Wu, Z. Li, X.-X. Chen, J. S. Fossey, T. D. James, Y.-B. Jiang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8032-8048.
- [19] S. Striegler, *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 81-102.
- [20] W. Zhai, X. Sun, T. D. James, J. S. Fossey, *Chem. - An Asian J.* **2015**, *10*, 1836-1848.
- [21] Y. Kubo, R. Nishiyabu, T. D. James, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2005-2020.
- [22] J. Turnbull, A. Powell, S. Guimond, *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 75-82.
- [23] S. J. Angyal, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1984**, *42*, 15-68.
- [24] H. P. Latscha, U. Kazmaier, H. A. Klein, *Organische Chemie - Chemie Basiswissen II*, **2008**, Springer Spektrum Verlag Heidelberg, 6. Auflage, S. 442-449.

- [25] B. L. S. I. Minnesota, <http://www.bioenergyribose.com/the-science>.
aufgerufen am: 11.08.2016, 17:02 Uhr
- [26] J. K. Gallos, T. V. Koftis, A. E. Koumbis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1994**, *1*, 25, 611.
- [27] G. Poeggel, *Endspurt Vorklinik: Biologie*, **2015**, Thieme Verlag Stuttgart, 3. Ausgabe, S. 24.
- [28] H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, and H. Kunz, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4495-4538.
- [29] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science*, **2001**, *291*, 2357-2364.
- [30] D. W. Martin, *Medizinische Biochemie*, **1986**, Springer Verlag Berlin Heidelberg, S. 509-528.
- [31] K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4465-4494.
- [32] M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58-68.
- [33] D. P. Gamblin, E. M. Scanlan, B. G. Davis, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131-163.
- [34] C. M. Taylor, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 11317-11362.
- [35] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. H. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684-11689.
- [36] T. J. Tolbert, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5421-5428.
- [37] S. T. Anisfeld, P. T. Lansbury, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5560-5562.
- [38] K. Witte, P. Sears, R. Martin, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2114-2118.
- [39] H. Paulsen, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1990**, *29*, 823-839.
- [40] G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 3045-3094.
- [41] G. Arsequell, G. Valencia, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 2839-2876.
- [42] R. R. Herr, G. Slomp, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 2444-2447.
- [43] J. B. Weiss, C. J. Lote, H. Bobinski, *Nat. New Biol.* **1971**, *234*, 25-26.
- [44] G. R. Fenwick, R. K. Heaney, W. J. Mullin, C. H. VanEtten, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1983**, *18*, 123-201.
- [45] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631-664.
- [46] C. Schips, *Dissertation*, **2005**, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- [47] B. Lünig, T. Norberg, J. Tejbrant, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3011-3014.
- [48] P. Sjölin, M. Elofsson, J. Kihlberg, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 560-565.
- [49] M. Elofsson, B. Walse, J. Kihlberg, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7613-7616.
- [50] G. Arsequell, N. Sàrries, G. Valencia, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7323-7326.

- [51] H. Kunz, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1987**, 26, 294-308.
- [52] H. M. I. Osborn, *Carbohydrates: Best Synthetic Methods*, **2003**, Academic Press England, S. 1-427.
- [53] L. K. Mydock, A. V Demchenko, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 497-510.
- [54] J.-P. Praly, R. U. Lemieux, *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 213-223.
- [55] H. Paulsen, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1982**, 21, 155-173.
- [56] M. Zourob, *Recognition Receptors in Biosensors*, **2010**, Springer Verlag New York, S. 285.
- [57] E. Fischer, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, **1893**, 26, 2400-2412.
- [58] B. Helferich, E. Schmitz-Hillebrecht, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, **1933**, 66, 378-383.
- [59] W. Koenigs, E. Knorr, *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*, **1901**, 34, 957-981.
- [60] R. R. Schmidt, J. Michel, *Angew. Chemie*, **1980**, 92, 763-764.
- [61] W. Kinzy, R. R. Schmidt, *Carbohydr. Res.* **1987**, 164, 265-276.
- [62] P. J. Garegg, C. Henrichson, T. Norberg, *Carbohydr. Res.* **1983**, 116, 162-165.
- [63] P. Fügedi, P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.* **1986**, 149, C9-C12.
- [64] R. J. Ferrier, R. W. Hay, N. Vethaviyasar, *Carbohydr. Res.* **1973**, 27, 55-61.
- [65] H. Lönn, *J. Carbohydr. Chem.* **1987**, 6, 301-306.
- [66] K. J. Jensen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2002**, 20, 2219-2233.
- [67] H. S. Isbell, *Annu. Rev. Biochem.* **1940**, 9, 65-92.
- [68] F. J. Urban, B. S. Moore, R. Breitenbach, *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 4421-4424.
- [69] V. J. Patil, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1481-1484.
- [70] R. R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, *Liebigs Ann. der Chemie*, **1984**, 1343-1357.
- [71] R. U. Lemieux, G. Huber, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 4118.
- [72] B. Ernst, C. Leumann, *Modern Synthetic Methods*, **1995**, VHCA Basel, 7. Auflage, S. 283-330.
- [73] S. J. Danishefsky, M. T. Bilodeau, *Angew. Chemie*, **1996**, 108, 1482-1522.
- [74] X. Zhu, R. R. Schmidt, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, 48, 1900-1934.
- [75] Y. Shimizu, S. Shaw, *Nature*, **1993**, 366, 630-631.
- [76] S. Tsuboi, M. Fukuda, *BioEssays*, **2000**, 23, 46-53.

- [77] M. Meldal, K. Book, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6987-6990.
- [78] J. van Ameijde, H. B. Albada, R. M. J. Liskamp, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2002**, *8*, 1042-1049.
- [79] P. M. St. Hilaire, T. L. Lowary, M. Meldal, K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13312-13320.
- [80] M. Mizuno, I. Muramoto, K. Kobayashi, H. Yaginuma, T. Inazu, *Synthesis*, **1999**, 162-165.
- [81] W. Günther, H. Kunz, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1990**, *29*, 1050-1051.
- [82] M. J. Grogan, M. R. Pratt, L. A. Marcaurelle, C. R. Bertozzi, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 593-634.
- [83] C. Unverzagt, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 5627-5630.
- [84] P. E. Dawson, S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923-960.
- [85] D. Horton, J. D. Wander, *Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry*, **1990**, Academic Press New York, S. 799.
- [86] S. B. Cohen, R. L. Halcomb, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6145-6152.
- [87] M. L. Sinnott, *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1171-1202.
- [88] B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinay, *Carbohydrates in Chemistry and Biology*, **2000**, Wiley-VCH Weinheim, S. 91-134.
- [89] M. R. Bond, J. J. Kohler, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 52-58.
- [90] N. Khidekel, S. B. Ficarro, E. C. Peters, L. C. Hsieh-Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 13132-13137.
- [91] D. H. Dube, J. a Prescher, C. N. Quang, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 4819-4824.
- [92] R. Sprung, A. Nandi, Y. Chen, S. C. Kim, D. Barma, J. R. Falck, Y. Zhao, *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 950-957.
- [93] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535-546.
- [94] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- [95] P. Ramachandran, P. Boontheung, Y. Xie, M. Sondej, D. T. Wong, J. A. Loo, *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1493-1503.
- [96] U. Lewandrowski, J. Moebius, U. Walter, A. Sickmann, *Mol. Cell. Proteomics*, **2005**, *5*, 226-233.
- [97] H. Zhang, X.-J. Li, D. B. Martin, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 660-666.
- [98] K. Sparbier, T. Wenzel, and M. Kostrzewa, *J. Chromatogr. B*, **2006**, *840*, 29-36.

- [99] K. Sparbier, S. Koch, I. Kessler, T. Wenzel, M. Kostrzewa, *J. Biomol. Tech.* **2005**, *16*, 407-413.
- [100] K. Vosseller, J. C. Trinidad, R. J. Chalkley, C. G. Specht, A. Thalhammer, A. J. Lynn, A. L. Burlingame *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics*, **2006**, *5*, 923-934.
- [101] H. Kaji, H. Saito, Y. Yamauchi, T. Shinkawa, M. Taoka, J. Hirabayashi, K. Kasai, N. Takahasi, T. Isobe, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 667-672.
- [102] J. Hirabayashi, K. Kasai, *J. Chromatogr. B*, **2002**, *771*, 67-87.
- [103] A. Sinz, *Mass Spectrom. Rev.* **2006**, *25*, 663-682.
- [104] W. Yang, X. Gao, B. Wang, *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 346-368.
- [105] X.-C. Liu, J. L. Hubbard, W. H. Scouten, *J. Organomet. Chem.* **1995**, *493*, 91-94.
- [106] J. Yan, G. Springsteen, S. Deeter, B. Wang, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 11205-11209.
- [107] J. N. Cambre, B. S. Sumerlin, *Polymer*, **2011**, *52*, 4631-4643.
- [108] G. E. Lienhard, K. A. Koehler, *Biochemistry*, **1971**, *10*, 2477-2483.
- [109] M. Philipp, M. L. Bender, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1971**, *68*, 478-480.
- [110] S. D. Bull, M. G. Davidson, J. M. H. van den Elsen, J. S. Fossey, A. T. A. Jenkins, Y. Kubo, F. Marken, K. Sakurai, J. Zhao, T. D. James, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 312-326.
- [111] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457-2483.
- [112] K. Ishihara, H. Yamamoto, *European J. Org. Chem.* **1999**, 527-538.
- [113] N. A. Petasis, I. A. Zavialov, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 445-446.
- [114] R. Latta, G. Springsteen, B. Wang, *Synthesis*, **2001**, *11*, 1611-1613.
- [115] W. Yang, X. Gao, G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6339-6342.
- [116] R. J. Ferrier, *Adv. Carbohydr Chem Biochem.* **1978**, *35*, 31-80.
- [117] H. Yu, B. Wang, *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 2719-2725.
- [118] G. S. Currie, M. G. B. Drew, L. M. Harwood, D. J. Hughes, R. W. A. Luke, R. J. Vickers, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2000**, *17*, 2982-2990.
- [119] K. Tohda, *Bunseki Kagaku*, **2013**, *62*, 903-914.
- [120] Y. J. Heo, S. Takeuchi, *Adv. Healthc. Mater.* **2013**, *2*, 43-56.
- [121] T. D. James, K. R. A. S. Sandanayake, S. Shinkai, *Angew. Chemie Int. Ed.* **1996**, *35*, 1910-1922.
- [122] W. Wang, X. Gao, B. Wang, *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 1285-1317.
- [123] Y.-J. Huang, W.-J. Ouyang, X. Wu, Z. Li, J. S. Fossey, T. D. James, Y.-B. Jiang, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1700-1703.

- [124] D. K. Scrafton, J. E. Taylor, M. F. Mahon, J. S. Fossey, T. D. James, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2871-2874.
- [125] J. F. Teichert, D. Mazunin, J. W. Bode, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11314-11321.
- [126] K. Mulla, P. Dongare, N. Zhou, G. Chen, D. W. Thompson, Y. Zhao, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1332.
- [127] X. Wang, N. Xia, L. Liu, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 20890-20912.
- [128] K. Yum, T. P. McNicholas, B. Mu, M. S. Strano, *J. Diabetes Sci. Technol.* **2013**, *7*, 72-87.
- [129] W. Wu, T. Zhou, A. Berliner, P. Banerjee, S. Zhou, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, *49*, 6554-6558.
- [130] K. V. Kong, Z. Lam, W. K. O. Lau, W. K. Leong, M. Olivo, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18028-18031.
- [131] X. Sun, B. Zhu, D.-K. Ji, Q. Chen, X.-P. He, G.-R. Chen, T. D. James, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2014**, *6*, 10078-10082.
- [132] Y. Guan, Y. Zhang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8106-8121.
- [133] G. F. Whyte, R. Vilar, R. Woscholski, *J. Chem. Biol.* **2013**, *6*, 161-174.
- [134] J. Myung, K. B. Kim, C. M. Crews, *Med. Res. Rev.* **2001**, *21*, 245-273.
- [135] A. Sugasaki, K. Sugiyasu, M. Ikeda, M. Takeuchi, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10239-10244.
- [136] W. Yang, S. Gao, X. Gao, V. V. R. Karnati, W. Ni, B. Wang, W. B. Hooks, J. Carson, B. Weston, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2175-2177.
- [137] A. H. Soloway, W. Tjarks, B. A. Barnum, F.-G. Rong, R. F. Barth, I. M. Codogni, J. G. Wilson, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1515-1562.
- [138] S. Kitano, Y. Koyama, K. Kataoka, T. Okano, Y. Sakurai, *J. Control. Release*, **1992**, *19*, 161-170.
- [139] K. Lacina, P. Skládal, T. D. James, *Chem. Cent. J.* **2014**, *8*, 60-77.
- [140] L. Liu, N. Xia, Y. Xing, D. Deng, *Int. J. Electrochem. Sci.* **2013**, *8*, 11161-11174.
- [141] J. Hansen, J. Christensen, *Biosensors*, **2013**, *3*, 400-418.
- [142] B. Kong, A. Zhu, Y. Luo, Y. Tian, Y. Yu, G. Shi, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50*, 1837-1840.
- [143] K. E. Secor, T. E. Glass, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3727-3730.
- [144] Y.-J. Huang, Y.-B. Jiang, J. S. Fossey, T. D. James, F. Marken, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 8305-8310.

- [145] F. Jäkle, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3985-4022.
- [146] S. Gao, W. Wang, B. Wang, *Bioorg. Chem.* **2001**, *29*, 308-320.
- [147] J. T. Suri, D. B. Cordes, F. E. Cappuccio, R. A. Wessling, B. Singaram, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2003**, *42*, 5857-5859.
- [148] C. Yu, V. W.-W. Yam, *Chem. Commun.* **2009**, *11*, 1347-1349.
- [149] Y. Kanekiyo, H. Sato, H. Tao, *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 1542-1546.
- [150] B. Appleton, T. Gibson, *Sensors Actuators B Chem.* **2000**, *65*, 302-304.
- [151] S. Arimori, K. a Frimat, T. D. James, M. L. Bell, C. S. Oh, *Chem. Commun.* **2001**, *4*, 1836-1837.
- [152] N. Y. Edwards, T. W. Sager, J. T. McDevitt, E. V Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13575-13583.
- [153] M. Li, W. Zhu, F. Marken, T. D. James, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 14562-14573.
- [154] R. Nishiyabu, Y. Kubo, T. D. James, J. S. Fossey, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 1106-1124.
- [155] J. N. Camara, J. T. Suri, F. E. Cappuccio, R. A. Wessling, B. Singaram, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1139-1141.
- [156] A. Kikuchi, K. Suzuki, O. Okabayashi, H. Hoshino, K. Kataoka, Y. Sakurai, T. Okano, *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 823-828.
- [157] F. H. Arnold, W. Zheng, A. S. Michaels, *J. Memb. Sci.* **2000**, *167*, 227-239.
- [158] P. Huh, S.-C. Kim, Y. Kim, Y. Wang, J. Singh, J. Kumar, L. A. Samuleson, B.-S. Kim, N.-J. Jo, J.-O. Lee, *Biomacromolecules*, **2007**, *8*, 3602-3607.
- [159] G. Springsteen, B. Wang, *Chem. Commun.* **2001**, *17*, 1608-1609.
- [160] G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 5291-5300.
- [161] G. A. Ellis, M. J. Palte, R. T. Raines, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3631-3634.
- [162] K. Haav, S. A. Kadam, L. Toom, P. A. Gale, N. Busschaert, M. Wenzel, J. R. Hiscock, I. L. Kirby, T. Haljasorg, M. Lokov, I. Leito, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7796-808.
- [163] Y. Furikado, T. Nagahata, T. Okamoto, T. Sugaya, S. Iwatsuki, M. Inamo, H. D. Takagi, A. Odani, K. Ishihara, *Chem. - A Eur. J.* **2014**, *20*, 13194-13202.
- [164] S. J. Baker, C. Z. Ding, T. Akama, Y.-K. Zhang, V. Hernandez, Y. Xia, *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 1275-1288.
- [165] C. A. Kettner, A. B. Shenvi, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 15106-15114.
- [166] M. S. L. Lim, E. R. Johnston, C. A. Kettner, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1831-1838.
- [167] C. Kettner, L. Mersinger, R. Knabb, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 18289-18297.

- [168] R. Baggio, D. Elbaum, Z. F. Kanyo, P. J. Carroll, R. C. Cavalli, D. E. Ash, D. W. Christianson, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8107-8108.
- [169] A. Zervosen, A. Bouillez, A. Herman, A. Amoroso, B. Joris, E. Sauvage, P. Charlier, A. Luxen, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3915-3924.
- [170] A. Paramore, S. Frantz, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 611-612.
- [171] J. Adams, *Oncologist*, **2002**, *7*, 9-16.
- [172] J. Adams, M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y. Ma, L. Plamondon, R. L. Stein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 333-338.
- [173] F. L. Rock, W. Mao, A. Yaremchuk, M. Tukalo, T. Crépin, H. Zhou, Y. Zhang, V. Hernandez, T. Akama, S. Baker, M. R. K. Alley *et al.*, *Science*, **2007**, *316*, 1759-1761.
- [174] S. J. Baker, J. W. Tomsho, S. J. Benkovic, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4279-4285.
- [175] P. C. Trippier, C. McGuigan, *Med. Chem. Comm.* **2010**, *1*, 183-198.
- [176] D. Siegel, *Analyst*, **2012**, *137*, 5457-5482.
- [177] H. Hofmeier, U. S. Schubert, *Chem. Commun.*, **2005**, 2423-2432.
- [178] S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders, J. F. Stoddart, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41*, 898-952.
- [179] D. J. Graves, E. G. Krebs, E. H. Fischer, *J. Biol. Chem.* **1959**, *234*, 2867-2873.
- [180] S. J. Beebe, J. D. Corbin, *The Enzymes*, **1986**, *17*, 43-111.
- [181] E. Miyamoto, J. F. Kuo, P. Greengard, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6395-6402.
- [182] E. G. Krebs, P. Perkins, D. A. Walsh, *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 3763-3774.
- [183] S. S. Taylor, C. Kim, C. Y. Cheng, S. H. J. Brown, J. Wu, N. Kannan, *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, *1784*, 16-26.
- [184] S. S. Taylor, P. Zhang, J. M. Steichen, M. M. Keshwani, A. P. Kornev, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, **2013**, *1834*, 1271-1278.
- [185] G.-Y. Carmen, S.-M. Víctor, *Cell. Signal.* **2006**, *18*, 401-408.
- [186] M. H. Rider, L. Bertrand, D. Vertommen, P. A. Michels, G. G. Rousseau, L. Hue, *Biochem. J.* **2004**, *381*, 561-579.
- [187] W. H. Beierwaltes, *AJP Ren. Physiol.* **2010**, *298*, F1-F11.
- [188] G. Manning, *Science*, **2002**, *298*, 1912-1934.
- [189] S. Shoji, D. C. Parmelee, R. D. Wade, S. Kumar, L. H. Ericsson, K. A. Walsh, H. Neurath, G. L. Long, J. G. Demaille, E. H. Fischer, K. Titani, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 848-851.

- [190] M. D. Uhler, D. F. Carmichael, D. C. Lee, J. C. Chrivia, E. G. Krebs, G. S. McKnight, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1986**, 83, 1300-1304.
- [191] S. S. Taylor, C. Kim, D. Vigil, N. M. Haste, J. Yang, J. Wu, G. S. Anand, *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, 1754, 25-37.
- [192] S. S. Taylor, J. Yang, J. Wu, N. M. Haste, E. Radzio-Andzelm, G. Anand, *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, 1697, 259-269.
- [193] D. A. Johnson, P. Akamine, E. Radzio-Andzelm, Madhusudan, S. S. Taylor, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2243-2270.
- [194] C. Kim, D. Vigil, G. Anand, S. S. Taylor, *Eur. J. Cell Biol.* **2006**, 85, 651-654.
- [195] L. A. Pinna, M. Ruzzene, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1996**, 1314, 191-225.
- [196] D. R. Knighton, J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, N. H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, *Science*, **1991**, 253, 414-420.
- [197] J. A. Ubersax, J. E. Ferrell Jr., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 530-541.
- [198] H. Köster, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2012**.
- [199] J. Zheng, E. A. Trafny, D. R. Knighton, N.-H. Xuong, S. S. Taylor, L. F. T. Eyck, J. M. Sowadski, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **1993**, 49, 362-365.
- [200] J. Zheng, D. R. Knighton, L. F. T. Eyck, R. Karlsson, N.-H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, *Biochemistry*, **1993**, 32, 2154-2161.
- [201] R. N. Armstrong, H. Kondo, E. T. Kaiser, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, 76, 722-725.
- [202] P. Cohen, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1, 309-315.
- [203] C. Breitenlechner, M. Gabel, H. Hidaka, V. Kinzel, R. Huber, R. A. Engh, D. Bossemeyer, *Structure*, **2003**, 11, 1595-1607.
- [204] A. Girod, R. A. Engh, V. Kinzel, R. Huber, D. Bossemeyer, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 26157-26164.
- [205] T. G. Davies, M. L. Verdonk, B. Graham, S. Saalau-Bethell, C. C. F. Hamlett, R. McHardy, I. Collins, D. Barford *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2007**, 367, 882-894.
- [206] P. Akamine, Madhusudan, L. L. Brunton, H. D. Ou, J. M. Canaves, N.-H. Xuong, S. S. Taylor, *Biochemistry*, **2004**, 43, 85-96.
- [207] A. Pflug, J. Rogozina, D. Lavogina, E. Enkvist, A. Uri, R. A. Engh, D. Bossemeyer, *J. Mol. Biol.* **2010**, 403, 66-77.
- [208] Y. Rikitake, H.-H. Kim, Z. Huang, M. Seto, K. Yano, T. Asano, M. A. Moskowitz, J. K. Liao, *Stroke* **2005**, 36, 2251-2257.

- [209] L. A. Pinna, P. T. W. Cohen, *Inhibitors of Proteinkinases and Protein Phosphates*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, **2005**, S. 93-95.
- [210] G.-P. Sun, M. Kohno, P. Guo, Y. Nagai, K. Miyata, Y. Fan, S. Kimura, H. Kiyomoto, K. Ohmori, D.-T. Li, Y. Abe, A. Nishiyama, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17*, 2193-2201.
- [211] M. Amano, M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, K. Kaibuchi, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20246-20249.
- [212] H. Shimokawa, K. Hiramori, H. Iinuma, S. Hosoda, H. Kishida, H. Osada, T. Katagiri, K. Yamauchi, Y. Yui, K. Kato *et al.*, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2002**, *40*, 751-761.
- [213] N. Ono-Saito, I. Niki, H. Hidaka, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 123-131.
- [214] T. Matsui, M. Amano, T. Yamamoto, K. Chihara, M. Nakafuku, M. Ito, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, K. Kaibuchi, *EMBO J.* **1996**, *15*, 2208-2216.
- [215] M. Takata, H. Tanaka, M. Kimura, Y. Nagahara, K. Tanaka, K. Kawasaki, M. Seto, K. Tsuruma, M. Shimazawa, H. Hara, *Br. J. Pharmacol.* **2013**, *170*, 341-351.
- [216] R. Wolfenden, *Acc. Chem. Res.* **1972**, *5*, 10-18.
- [217] K. D. Collins, G. R. Stark, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 6599-6605.
- [218] D. Lavogina, E. Enkvist, A. Uri, *Chem. Med. Chem.* **2010**, *5*, 23-34.
- [219] K. Parang, P. A. Cole, *Pharmacol. Ther.* **2002**, *93*, 145-157.
- [220] W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 4046-4050.
- [221] T. C. Bruice, S. J. Benkovic, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 6267-6274.
- [222] G. E. Lienhard, I. I. Secemski, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 1121-1123.
- [223] C. H. Kruse, K. G. Holden, M. L. Pritchard, J. A. Field, D. J. Rieman, R. G. Greig, G. Poste, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1762-1767.
- [224] A. Ricouart, J. C. Gesquiere, A. Tartar, C. Sergheraert, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 73-78.
- [225] M. Loog, A. Uri, G. Raidaru, J. Järv, P. Ek, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1447-1452.
- [226] A. A. Profit, T. R. Lee, J. Niu, D. S. Lawrence, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9446-9451.
- [227] A. Profit, T. Lee, D. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 280-283.
- [228] D. Medzihradzky, S. L. Chen, G. L. Kenyon, B. W. Gibson, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9413-9419.
- [229] G. Rossé, U. Séquin, H. Mett, P. Furet, P. Traxler, H. Fretz, *Helv. Chim. Acta*, **1997**, *80*, 653-670.

- [230] S. R. Hubbard, P. A. Cole, K. Parang, J. H. Till, A. J. Ablooglu, R. A. Kohanski, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 37-41.
- [231] D. Lavogina, M. Lust, I. Viil, N. König, G. Raidaru, J. Rogozina, E. Enkvist, A. Uri, D. Bossemeyer, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 308-321.
- [232] A. Vaasa, I. Viil, E. Enkvist, K. Viht, G. Raidaru, D. Lavogina, A. Uri, *Anal. Biochem.* **2009**, 385, 85-93.
- [233] E. Enkvist, K. Viht, G. Raidaru, D. Lavogina, A. Uri, A. Vaasa, I. Viil, M. Lust, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7150-7159.
- [234] M. Loog, A. Uri, J. Järv, P. Ek, *FEBS Lett.* **2000**, 480, 244-248.
- [235] K. Viht, S. Schweinsberg, G. Raidaru, D. Lavogina, A. Uri, A. Vaasa, M. Lust, F. W. Herberg, *Anal. Biochem.* **2007**, 362, 268-277.
- [236] A. Uri, G. Raidaru, J. Subbi, K. Padari, M. Pooga, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 2117-2120.
- [237] K. J. Kayser-Bricker, M. P. Glenn, S. H. Lee, S. M. Sebt, J. Q. Cheng, A. D. Hamilton, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 1764-1771.
- [238] K. J. Kayser, M. P. Glenn, S. M. Sebt, J. Q. Cheng, A. D. Hamilton, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 2068-2073.
- [239] N. J. Greenfield, *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 2876-2890.
- [240] K. Wüthrich, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 923-925.
- [241] H. Günther, *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*, Wiley-VCH Weinheim, **2013**.
- [242] K. Wüthrich, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 3462-3486.
- [243] H. Kessler, C. Griesinger, K. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 6927-6933.
- [244] M. Ohnishi, D. W. Urry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, 36, 194-202.
- [245] H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1982**, 21, 512-523.
- [246] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenár, *J. Biomol. NMR* **1992**, 2, 661-665.
- [247] D. I. Hoult, *J. Magn. Reson.* **1976**, 21, 337-347.
- [248] T. Inubushi, E. Becker, *J. Magn. Reson.* **1983**, 51, 128-133.
- [249] C. Schmidthaus, *Dissertation*, Ruhr-Universität Bochum, **1999**.
- [250] J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 2455-2463.
- [251] I. R. Kleckner, M. P. Foster, *Biochim. Biophys. Acta.* **2011**, 1814, 942-968.

- [252] S. P. Davies, M. Caivano, P. Cohen, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2001**, *11*, 405-429.
- [253] J.-H. Kang, Y. Jiang, R. Toita, J. Oishi, K. Kawamura, A. Han, T. Mori, T. Niidome, M. Ishida, K. Tatematsu, K. Tanizawa, Y. Katayama, *Biochimie*, **2007**, *89*, 39-47.
- [254] P. L. Durette, D. Horton, N. S. Bhacca, *Carbohydr. Res.* **1969**, *10*, 565-577.
- [255] R. U. Lemieux, J. D. Stevens, *Can. J. Chem.* **1966**, *44*, 249.
- [256] M. Levy, E. A. Doisy, *J. Biol. Chem.* **1928**, *77*, 733-751.
- [257] J. Böeseken, *Ber. chem. Ges.* **1913**, *46*, 2612-2628.
- [258] H. Cao, T. McGill, M. D. Heagy, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2959-2966.
- [259] R. A. Kirschner, *Masterarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2013**.
- [260] R. A. Kirschner, A. Geyer, *ChemistrySelect*, **2016**, *1*, 15, 4570-4576.
- [261] T. Zimmer, *Bachelorarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2013**.
- [262] S. N. Fischer, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2014**.
- [263] A. D. Bain, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2003**, *43*, 63-103.
- [264] L. Liang, Z. Liu, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2255-2257.
- [265] N. Lokesh, S. L. Sachin, L. V. Narendra, K. Arun, N. Suryaprakash, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7230-7235.
- [266] R. van den Berg, J. Peters, H. van Bakkum, *Carbohydr. Res.* **1994**, *253*, 1-12.
- [267] G. Saito, J. A. Swanson, K.-D. Lee, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 199-215.
- [268] D. C. Schwartz, M. Hochstrasser, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 321-328.
- [269] F. L. Rock, W. Mao, A. Yaremchuk, M. Tukalo, T. Crépin, H. Zhou, Y.-K. Zhang, M. R. K. Alley et al. *Science*, **2007**, *316*, 1759-1761.
- [270] D. B. Glass, H.-C. Cheng, L. Mende-Mueller, J. Reed, D. A. Walsh, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8802-8810.
- [271] J. Reed, J. S. De Ropp, J. Trehwella, D. B. Glass, W. K. Liddle, E. M. Bradbury, V. Kinzel, D. A. Walsh, *Biochem. J.* **1989**, *264*, 371-380.
- [272] D. Bossemeyer, R. A. Engh, V. Kinzel, H. Ponstingl, R. Huber, *The EMBO J.* **1993**, *12*, 849-859.
- [273] A. Pardi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 741-751.
- [274] D. R. Knighton, J. Zheng, L. F. Ten Eyck, N.-H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, *Science*, **1991**, *253*, 414-420.

- [275] J. Zheng, D. R. Knighton, N.-H. Xuong, S. S. Taylor, L. F. Ten Eyck, J. M. Sowadski, *Protein Science* **1993**, 2, 1559-1573.
- [276] J. Reed, V. Kinzel, H.-C. Cheng, D. A. Walsh, *Biochemistry*, **1987**, 26, 7641-7647.
- [277] A. Pardi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1984**, 180, 741-751.
- [278] N. Vasdev, F. J. LaRonde, J. R. Woodgett, A. Garcia, E. A. Rubie, J. H. Meyer, S. Houle, A. A. Wilson, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 5277-5284.
- [279] M. K. Groftehaug, N. R. Hajizadeh, M. J. Swann, E. Pohl, *Acta Cryst.* **2015**, D71, 36-44.
- [280] F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, *Nature Protocols*, **2007**, 2, 2212 - 2221.
- [281] K. Huynh, C. L. Partch, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2015**, 79, 28910 - 28914.
- [282] J. J. Lavinder, S. B. Hari, B. J. Sullivan, T. J. Magliery, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 3794-3795.
- [283] A. Winter, A. P. Higuero, M. Marsh, A. Sigurdardottir, W. R. Pitt, T. L. Blundell, *Q. Rev. Biophys.* **2012**, 45, 383-426.
- [284] J. E. Nettleship, J. Brown, M. R. Groves, A. Geerlof, *Methods Mol. Biol.* **2008**, 426, 299-318.
- [285] M. D. Cummings, M. A. Farnum, M. I. Nelen, *J. Biomol. Screen.* **2006**, 11, 854-863.
- [286] S. Duhr, D. Braun, *PNAS*, **2006**, 103, 19678-19682.
- [287] M. Jerabek-Willemsen, C. J. Wienken, D. Braun, P. Baaske, S. Duhr, *Assay Drug Dev. Technol.* **2011**, 9, 342-353.
- [288] C. Wienken, P. Baaske, U. Rothbauer, D. Braun, S. Duhr, *Nat. Commun.* **2010**, 1, 1-7.
- [289] P. Baaske, C. J. Wienken, P. Reineck, S. Duhr, D. Braun, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2238-2241.
- [290] Y. Liu, N. Liu, X. Ma, X. Li, J. Ma, Z. Zhou, Z. Gao, *Analyst*, **2015**, 140, 2762-2770.
- [291] R. Hrdina, F. M. Metz, M. Larrosa, J.-P. Berndt, Y. Y. Zhygadlo, S. Becker, J. Becker, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6231-6236.
- [292] S. Fischer, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2015**.
- [293] A. Schrimpf, A. Geyer, *ChemBioChem.* **2016**, 17, 2129-2132.
- [294] A. Roeder, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2012**.
- [295] C. V. Garcia De Gonzalo, L. Zhu, T. J. Oman, W. A. van der Donk, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 796-801
- [296] B. J. Gibbons, P. J. Roach, T. D. Hurley, *J. Mol. Biol.* **2002**, 319, 463-477.

- [297] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, P. Zou, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3685-3689.
- [298] Y. S. Y. Hsieh, B. L. Wilkinson, M. R. O'Connell, J. P. Mackay, J. M. Matthews, R. J. Payne, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1910-1913.
- [299] H. Cai, Z.-H. Huang, L. Shi, P. Zou, Y.-F. Zhao, H. Kunz, Y.-M. Li, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3685-3689.
- [300] F.-G. Hanisch, S. Müller, *Glycobiology*, **2000**, *10*, 439-449.
- [301] G. G. Bon, P. Kenemans, G. J. van Kamp, C. A. Yedema, J. Hilgers, *J. Nucl. Allied Sci.* **1990**, *34*, 151-162.
- [302] M. A. Brimble, P. J. Edwards, P. W. R. Harris, G. E. Norris, M. L. Patchett, T. H. Wright, S.-H. Yang, S. E. Carley, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 3556-3561.
- [303] M. K. Groftehaug, N. R. Hajizadeh, M. J. Swann, E. Pohl, *Acta Cryst.* **2015**, *D71*, 36-44.
- [304] T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaara, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508-7510.
- [305] S. Kotha, K. Lahiri, *Biopolymers* **2003**, *69*, 517-528.
- [306] A. J. J. Lennox, G. C. Lloyd-Jones, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 412.
- [307] S. A. W. Gruner, E. Locardi, E. Lohof, H. Kessler, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 491-514.
- [308] D. Comegna, I. de Paola, M. Saviano, A. Del Gatto, L. Zaccaro, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 640-643.
- [309] N.-D. Doan, S. Bourgault, M. Létourneau, A. Fournier, *J. Comb. Chem.* **2008**, *10*, 44-51.
- [310] C. Garbay-Jaureguiberry, B. P. Roques, R. Oberlin, *FEBS Lett.* **1977**, *76*, 93-98.
- [311] D. S. Wishart, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, *58*, 62-87.
- [312] M. Körling, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2015**.
- [313] D. C. Dalgarno, B. A. Levine, R. J. P. Williams, *Biosci. Rep.* **1983**, *3*, 443-452.
- [314] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 311-333.
D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *Biochemistry*, **1992**, *31*, 1647-1651.
- [315] B. Eckhardt, W. Grosse, L.-O. Essen, A. Geyer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 18336-18341.
- [316] D. B. G. Williams, M. Lawton, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8351-8354.
- [317] N. Gaidzik, U. Westerlind, H. Kunz, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4421-4442.

8. Anhang

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich meinen Dank an all diejenigen richten, die mich während meiner Promotion begleitet haben und zu einem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit, in welcher Form auch immer, beigetragen haben.

JUN. PROF. DR. OLALLA VÁZQUEZ danke ich vielmals für die Übernahme des Zweitgutachtens.

PROF. DR. GERHARD KLEBE möchte ich für die Bereitschaft danken, der Prüfungskommission anzugehören und für die Hilfestellungen und Denkanstöße während der Kooperationsarbeit.

Bei allen Mitarbeitern der NMR-Abteilung DR. XIULAN XIE, DR. RONALD WAGNER, GERT HÄDE und CORNELIA MISCHKE an der Philipps-Universität Marburg, die sich stets fleißig und gewissenhaft um meine Aufträge gekümmert haben. Auch bedanke ich mich für die Möglichkeit der zahlreichen Selbstmessungen am 600 MHz-Spektrometer.

Mein Dank geht weiterhin an die Mitarbeiter der massenspektrometrischen Abteilung DR. UWE LINNE, JAN BAMBERGER, MARTINA GERLACH, TINA KRIEG, HEIKE MALLINGER, YVONNE ULRICH und ANNA-LENA HEMER für die Aufnahme der Massenspektren sowie die Durchführung der LC-MS-Messungen.

Bei JANIS MÜLLER aus der Arbeitsgruppe KLEBE (Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) möchte ich mich für die diversen Messungen im Rahmen der LOEWE-Kooperation danken und die gute Zusammenarbeit währenddessen. Allen weiteren Kooperationspartnern des Projekts danke ich ebenfalls für die gemeinsame Arbeit, sowie dem Land Hessen für die generelle Forschungsförderung im Rahmen des LOEWE-Programms.

Mein besonderer Dank gilt unserer Anführerin SUSANNE SCHELLENBERG für die vielen unterhaltsamen Gespräche über den Tag verteilt, für die organisatorische Übersicht im Arbeitskreis, die Verwaltung und Beaufsichtigung vielerlei Dinge und für deine Fürsorge uns gegenüber!

Nicht zu vergessen ist DR. CARSTEN AUDEL, dem ich auf diesem Weg ebenfalls für seine ausgesprochen hilfreiche Art und seinem steten Einsatz am gesamten FB 15 danken möchte. Auf dich konnte man immer zählen!

Danksagung

Meinen Bachelor-Studenten (PHUONG PHAM und TIMO ZIMMER) sowie meinen Vertiefungs-Studenten (JOHANNA PLAG, YVONNE GRELL, PHUONG PHAM und LUKAS ZYGALSKY) möchte ich für ihre Motivation und Mitarbeit danken

Michelle Krüger danke ich für die sehr gute Unterhaltung im AK. Du weißt auf jeden Fall wie man feiert und die richtige *work-life-balance* schafft. Ich drücke dir die Daumen, dass du irgendwann mal in den Besitz eines echten Einhorns kommst :)

Generell möchte ich allen ehemaligen Mitgliedern des AK GEYERS für die gute gemeinsame Zeit auf dem Berg danken. Im Speziellen richtet sich mein Dank dabei an:

DR. MARYNA ABACILAR, die zu jeder erdenklichen Zeit ein offenes Ohr für mich hatte und stets für mich da war. Du hast mich nicht nur in der Uni mit fachlichen Ratschlägen weitergebracht, sondern auch über den Kollegenstatus hinaus für eine schöne Zeit im AK gesorgt. Es liegt mir sehr am Herzen, dass wir uns auch weiterhin nicht aus den Augen verlieren und den Kontakt wahren!

Mein Dank gilt auch DR. MATTHIAS LAMPING, dessen gute Laune den Arbeitskreis sehr bereichert hat. Ich danke dir für das Korrekturlesen einiger Teile dieser Arbeit, für deine lockere und unkomplizierte Art, durch die du immer ein ausgezeichnete Gesprächspartner warst und für die läuferischen Aktivitäten nach der Uni. Dir und LAURA wünsche ich alles Gute für die bald beginnende, gemeinsame Zukunft und hoffe, dass wir in Kontakt bleiben!

Danke auch an DR. ANDRÉ WUTTKE, der sicherlich mindestens genauso viel Spaß mit den Boronsäuren hatte, wie ich und mir aber zum Glück viele wertvolle Tipps und Tricks auf diesem Gebiet verraten hat. Deine „Grüße und so“ über den Tag verteilt und gelegentliche „rump*****ei“ mit herrlich zynischen Gesprächen und Kaffee haben den Labortag definitiv aufgewertet.

DR. MATTHIAS KÖRLING danke ich für seine fachliche Kompetenz, mit der er dem Arbeitskreis stets dienlich war. Von deiner Arbeit und Wartung der HPLC konnten wir alle profitieren. Und auch die vielen sportlichen und kulinarischen Aktivitäten außerhalb der Uni waren eine willkommene Ablenkung vom Arbeitsalltag.

Auch an die aktuellen Mitarbeiter des AK GEYERS richtet sich mein Dank und die besten Wünsche für den bevorstehenden Abschluss der Promotion.

Danksagung

ANDREAS SCHRIMPF - „Merci vielmol“ für alle tiefgründigen, aufbauenden, zynischen und humoristischen Konversationen, sei es am Schreibtisch, beim Kaffee oder bei zahlreichen köstlichen Kochabenden gewesen und natürlich auch fürs Korrekturlesen. Die kulinarischen Highlights dieser Welt werden wir hoffentlich auch weiterhin ergründen - gerne auch mit guat (aka al dente) gekochten Nudeln! Bei gutem Wetter könnten wir auch mal Inliner fahren gehen ;)

Bei STEFAN LENZ bedanke ich mich für viele unterhaltsame Stunden im Kaffeeraum, zahlreichen Gesprächen über die Vorzüge des Reisens und den *outstanding* Tipps zur Kletterei- und Camping-Ausrüstung. Sicherlich begegnen wir uns irgendwo auf der Welt auf irgendeinem Berg mal wieder.

Weiterhin möchte ich MAXIMILIAN JUNG für sein überaus hilfreiches Wesen und sein gutes Herz danken. Zwar hast du manchmal die Aufmerksamkeitsspanne eines Eichhörnchens, aber wenn du für eine Sache einsteht, bist du auf jeden Fall 200 %ig bei der Sache. Weiterhin viel Erfolg beim Vorantreiben der Peptid-Generationen und Tyrosin-Modifikationen.

LENNART NICKE danke ich für die ausgezeichnete Kaffee-Versorgung und seine lustigen Sprüche anglophiler Natur, die den ganzen Arbeitskreis infiziert haben. Deine „nicken“ Phrasen wie „*a column a day keeps the doctor away*“ oder „*chlorophizzle*“ haben den Laboralltag auf jeden Fall deutlich aufgelockert.

Bei CHRISTOPH PRIEM bedanke ich mich für die unermüdliche Schulung meiner Geduld und Selbstbeherrschung beim täglichen Hindernis-Parkour beim Mittagessen. Dank deines Quarks mit Donut kam mir mein Mittagessen auch am vierten Tag in Folge nicht langweilig vor ;) Viel Erfolg weiterhin mit den Collagenen! Nicht zu vergessen: „Quark formte diesen Körper“!

Auch bedanke ich mich bei PHILIP HORX, dem Wolf im Chefspelz, der immer wieder mit lustigen Sprüchen auf sich aufmerksam macht. Viel Erfolg weiterhin mit deinen Zinkfingern und ich hoffe du wirst hier fertig, bevor du dir ein permanentes „rrr“-Rollen aneignest ;)

Mein Dank geht auch an FABIAN DAUS der sich immer gewissenhaft um die Müllbeseitigung im AK gekümmert hat, wenn mal wieder keine Vertiefer/Bachelor zur Verfügung standen.

Nicht zu vergessen sind all meine Freunde, die mich auf dem Weg hierher begleitet haben. Unter anderen EVA-MARIA SPRENGER, ehemals Laborkollegin, die lange Zeit an meiner Seite gekämpft hat und ANDRÉ SCHMIEGEL, der stets für jegliche Sportarten zur Verfügung stand und zu einem geschätzten Zeitgenossen geworden ist.

Danksagung

Meinem liebsten FLORIAN möchte ich für die wunderbare gemeinsame Zeit danken, die wir seither miteinander verbringen konnten und dafür, dass du mich immer wieder mit Motivation versorgt hast, um diese Arbeit zu beenden. Niemand außer dir kann mir so offen zeigen, dass er an meine Fähigkeiten glaubt, was mir ungeheure Kraft schenkt und (nicht nur) dafür liebe ich dich sehr!

Mein ganz besonderer Dank gilt MEINEN ELTERN und der übrigen Familie. Es steht außer Frage, dass Ihr das größte Erfolgsrezept hinter dieser Arbeit wart. Danke für die stete Unterstützung jeglicher Form, den Rückhalt und Zuspruch. Ich bin sehr froh, dass ich euch habe und ihr immer für mich da seid!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass noch keine Promotion an einer anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass ich meine vorgelegte Dissertation:

„Ribopyranosylierte Peptide als Bausteine für den reversiblen Aufbau von Bisubstrat-Inhibitoren der Proteinkinase A“

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst habe, ohne andere als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet zu haben. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet und diese Dissertation in der vorliegenden oder ähnlichen Form wurde noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht.

Marburg, 11.08.2017

Romina Anna Kirschner